EXD

岡山大学
農學部學術報告
第6号

SCIENTIFIC REPORTS
OF THE
FACULTY OF AGRICULTURE
OKAYAMA UNIVERSITY
No. 6

昭和30年3月
MARCH 1955

岡山大学農学部発行

PUBLISHED BY THE FACULTY OF AGRICULTURE
OKAYAMA UNIVERSITY, OKAYAMA, JAPAN

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/scientific-reports-faculty-of-agriculture-okayama-uni_1955-03_30_6

目　　次

米田茂男
河内知道：干拓地土壌の物理的性質と其の改良法に関する研究…………………… 1

第1報　炭酸カルシウムの溶解度及び置換性塩基の組成に及ぼす硫化鉄の影響について

池田長守
宇渡清六：薄荷の育種学的研究 ……………………………………………………………12

第4報　オランダハッカ及びこれと日本薄荷との F_1 の細胞遺伝学的研究

和田宏
湯原正高：人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究……………………………20

(3). 牡牛精液に於ける Hyaluronidase の分布．及び添加 Hyaluronidase 製剤の精子による吸着

和田宏
竹原宏
湯原正高：人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究……………………………29

(4). 牡牛精液の受精力に対する Hyaluronidase 製剤の効果

小合龍夫
笹井一男：作物の塩害に関する研究……………………………………………………………43

第1報　その2　小麦の幼穂形成期に与えられた塩水がその後の生育並に稔実に及ぼす影響

Contents

YONEDA and T. KOCHI :

Studies in Physical Properties of Polder Soils and Method of Reclamation. 1

1. Effects of Iron Sulfide on the Solubility of Calcium Carbonate and Composition of Exchangeable Bases of Polder Soils.

IKEDA and S. UDO :

Studies of Mint Breeding. IV 12

Cytogenetical Studies on *Mentha spicata* L. var. *crispa* BENTH. and the F_1 Hybrids which involve *M. spicata* L. var. *crispa* BENTH. and *M. arvensis* L. var. *piperascens* MAL.

WADA and M. YUHARA :

Studies on Hyaluronidase in the Artificial Insemination. 20

(3). Distribution of Hyaluronidase in the Bull Semen and Absorption of Added Hyaluronidase Preparation by Spermatozoa.

WADA, H. TAKEHARA and M. YUHARA :

Studies on Hyaluronidase in the Artificial Insemination. 29

(4). Effect of Hyaluronidase Prepalation on the Fertility of Bull Semen.

OGŌ and K. SASAI :

Studies on the Saline Injury on Crops. 43

I—2. The Effect on the Growth and on the Maturity of Wheat as produced by the Saline Water Irrigation at the Ear Formation Period.

干拓地土壌の物理的性質と其の改良法に関する研究

第１報　炭酸カルシウムの溶解度及び置換性塩基の組成に及ぼす硫化鉄の影響について

米　田　茂　男・河　内　知　道

Studies in Physical Properties of Polder Soils and Method of Reclamation : 1. Effects of Iron Sulfide on the Solubility of Calcium Carbonate and Composition of Exchangeable Bases of Polder Soils.

Shigeo YONEDA and Tomomichi KŌCHI

The greater part of younger halogenetic polder soils in the 6 th and the 7 th section of Kojima Polder consist of heavy clay and have sticky, puddled structure and are quite impervious to water. It was found that the younger polder soils contain a large amount of the soluble salts, and of the exchangeable bases, the MgO and Na_2O are more prominent. As is well known, the abnormal composition of exchangeable bases is considered to be the major factor of the poor physical condition of these polder soils.

The experimental work reported in this paper deals with the problem of the effects of iron sulfide which has been formed in polder soils under an anaerobic condition on the solubility of added calcium carbonate and the composition of exchangeable bases after drainage.

Kojima heavy clay soil and Fukuda loamy soil were chosen for the test and calcium carbonate and starch were added to each soil sample. All of the soil samples were preliminarily incubated in water-logged condition for about one year and then incubated at 30°C under the condition of the moisture content of field capacity for several weeks. Changes of pH and soluble salts by reduction and oxidation of samples were determined. (Table 1) The comparison of exchangeable bases between original soils and incubated samples was made. (Table 2 & 3) The incubated samples were leached by carbonate water for five times. Successive and total losses of CaO, MgO and SO_3 in every leachate were determined. (Table 6 & 7)

The comparison of exchangeable bases between incubated samples and leached samples was made. (Table 2 & 3)

The results obtained may be summarized as follows :

(1) The reaction of water-logged standard samples is alkaline, pH ranging from 7.2 to 10.3. After incubation, iron sulfide oxidizes and most of these samples show strong acidities, ranging from pH 4.3 to 6.1, and water-soluble sulfates and calcium

increased greatly. After leaching, the exchangeable bases are replaced by hydrogen and percentage base saturation is decreased to a maked extent in every soil.

(2) The reaction of water-logged samples, to which calcium carbonate was added is more alkaline as compared with standard samples. The pH values of these samples decrease to some degree after incubation but they remain neutral to slightly alkaline, ranging from pH 7.0 to 8.0. In the incubated samples, there is a marked increase of water-soluble sulfates and calcium and exchange calcium, but exchange Mg, Na and K are decreased.

It appears that during incubation most of the iron sulfide oxidizes; the H_2SO_4 formed reacts with the $CaCO_3$ and $CaSO_4$ is formed; the $CaSO_4$ rapidly changes the sodium clay into calcium clay. During the leaching process, the solution of $CaCO_3$ and the exchange of Ca for Na and Mg proceeds to a large extent; consequently a considerable part of exchange Na and Mg are replaced by Ca in the final situation.

(3) The greater part of soluble calcium and magnesium are leached in the first leachate from the standard samples but considerable quantities are leached successively in every leachate from the samples to which $CaCC_3$ is added. A far greater SO_3 outgo occurs from the first leachate of standard samples than from the $CaCO_3$ added samples. It appears that $CaCO_3$ retards the oxidation of iron sulfide during incubation.

緒　　言

児島湾沿岸に展開する干拓地土壌中，目下開墾中の第6区及び第7区に分布する天然型土壌の多くは重粘なる埴土より成り，その中には表土から下層土に至る迄膠質粘土（径2μ以下）が約40%以上を占める重粘土も少くなく，且つ多量の塩分を含み，置換複合体は略塩基で飽和されている．置換性塩基としては既報[9]の如く Mg と Na とが正常土に比べて異常に高率を占め，置換容量に対する100分率にて示す場合 Ca：19.1～35.7%，Mg：28.9～46.4%，Na：14.6～31.8%，K：1.2～12.8%の範囲にあり，マグネシウム・ナトリウム粘土より構成され，Hissink[5]及び Zuur[8]の報ずるオランダの干拓初期の土壌と近似した組成を示す．従つて土壌の物理的性質は極度に不良で，剛性形態に於ては固結性，堅硬性は頗る大で煉瓦状に固まる一方可塑性も著るしく大で，粘着，粘稠性を示し，更に液性形態では高度に解膠，膨潤性を示して羊羹状を呈し，その結果透水性も甚しく不良である．このことは除塩を困難ならしめる一方畑作物の生育にも障害を及ぼし，特に発芽と幼植物の生育を阻害し，更には耕耘作業をも著るしく困難ならしめる．従つて本地区の土壌改良を行う場合には先づ第一に，物理的狀態の改良に重点を置く必要あることは明白であるが，上記の置換性塩基の組成より明な如く，土壌溶液中の Ca イオン濃度を增加させることによつて，之をカルシウム粘土に転化させることが改良の根本と考える．而して土壌溶液中の Ca イオン濃度の增加は，それ自体が解膠，分散性のコロイドを凝固させる作用を行うことによつて，土壌の透水性及び其他の物理的狀態の改良に効果的であることは既に報[10]じた通りである．かかる目的で従来アルカリ土壌の改良には広く石膏が使用されているが，之に対して炭酸カルシウムは既往のアルカリ土壌の改良試験によると，土壌の含塩量が多く且つ反応がアルカリ性を呈する場合には炭酸カルシウムの溶解度の小なることから，その効果は殆んど認められないと報[7]じられている．

HISSINK[3] は湿潤なるオランダの気候条件では塩成干拓地土壌の改良は乾性及び半乾性地方のアルカリ土壌の改良と稍趣を異にすること，$CaCO_3$ に富むオランダの干拓地土壌に於ては所含硫化鉄が好気的状態に於ては酸化され，生成せる硫酸が $CaCO_3$ と反応して水溶性の $CaSO_4$ と $Ca(HCO_3)_2$ を生じ，この変化によつてマグネシウム・ナトリウム粘土は次第にカルシウム粘土に転化することを報じている．

児島湾沿岸の干拓初期の土壌中には可なりの硫化鉄が含まれ，之を予め湛水下に放置せる後畑水分状態で incubate する場合，強酸性に転ずる場合のあることは既に報[12, 14]じた通りである．

児島干拓地土壌中の10% HCl 可溶性の石灰は何れも1%以下で，その量は多くないが，若し開墾初期に炭酸カルシウムを施用する場合は或はオランダの干拓地に見られる如く，その溶解度の増加と之に基づく塩基置換によつてカルシウム粘土を生じ，延いては物理的性質の改良の目的も或る程度達しうるのではなかろうか，との予想の下に本研究を行つた．

酸化還元による反應及び可溶性塩類の變化

1 実 験 方 法

児島干拓7区の土壌（1732試料）と比較の対象として高梁川河口沿岸の福田干拓地の土壌（1733試料）の各表土と下層土を供試し，之に風乾土に対して $CaCO_3$ として4%及び澱粉の2%相当量を添加した試料を湛水下に約1年放置せる場合と，これ等の試料を更に畑水分状態で 30°C の定温器中で約75日間 incubate せる場合の夫々につき組成の変化を比較実験した．

供試土壌の一般組成は既報[9]の通りで，7区土壌は共に重粘土，福田土壌の表土は壌土，下層土は砂壌土である．尚供試土壌の $FeS_2+\alpha$ に相当する SO_3 含量と10% HCl 可溶性石灰の量は次の通りである．

土壌	SO_3 %	CaO %	土壌	SO_3 %	CaO %
1732—1	0.77	1.00	1733—1	0.24	0.42
1732—2	0.59	0.45	1733—2	0.45	0.54

2 実験成績及び論議

酸化還元に伴う土壌の反応及び可溶性塩類の変化は Table 1 に示す通りである．

FeS　湛水試料の FeS 含量をみるに，何れの場合にも澱粉添加によつて FeS 生成量は増加し，特に重粘なる児島干拓土壌でその傾向が顕著である．澱粉無添加の各試料間の FeS 含量には大差を認めない．

反　　應　湛水試料の反応をみるに，何れの場合にも $CaCO_3$ 或は澱粉の添加によつて反応はアルカリ性に傾き，特に両物質を共用する場合に pH の増加は最も大である．次にこれ等の試料を incubate する場合，pH 価は例外なく低下するが，特に $CaCO_3$ 無添加の場合にその傾向が顕著で，何れも酸性に転じ，福田土壌は強酸性を示した．但し澱粉添加の影響は認められない．之に対して $CaCO_3$ 添加試料の pH 価は7～8の範囲を示し，土壌の酸性化は認められない．

可溶性塩類　Cl 含量をみるに同一土壌に於ても処理を異にした試料間で可なりの差が認められるが，之は各試料を湛水下に放置する期間中に水分の蒸発に伴つて可溶性塩類の一部が壜の口より外部に洩れたためで，従つて正確な判断を下すことはできないが大凡の傾向を察知することはできる．即ち湛水下の試料では 1732—1 試料を除き，概して $CaCO_3$ 添加によつて可溶性 SO_3 が減少する傾向が認められるが可溶性 CaO の含量には一定の傾向は認められない．

Table 1 Changes of pH and soluble salts by reduction and oxidation of soils

Soil No. & Treatment	Samples under the water-logged condition						Samples after the incubation				
	pH (H_2O)	SO_3 (FeS) %	Soluble salts %				pH (H_2O)	Soluble salts %			
			Total solids	Cl	SO_3	CaO		Total solids	Cl	SO_3	CaO
1732-1 (Kojima Polder, Surface soil)											
A. O : Standard	7.2	0.006	0.628	0.266	0.073	0.009	4.9	1.896	0.272	0.759	0.093
A. Ca : $CaCO_3$ 4%, added	8.5	0.005	0.882	0.346	0.139	0.016	7.6	1.200	0.369	0.329	0.064
A. S : Starch 2%, added	8.7	0.161	0.692	0.328	0.032	0.004	4.9	2.488	0.334	1.026	0.129
A. Ca+S : $CaCO_3$ 4%+ Starch 2%, added	9.9	0.146	0.487	0.239	0.036	0.006	7.5	1.168	0.228	0.437	0.076
1732-2 (Kojima Polder, Subsoil)											
B. O : Standard	8.8	0.003	0.844	0.452	0.117	0.012	6.0	2.092	0.509	0.650	0.076
B. Ca : $CaCO_3$ 4%, added	9.9	0.007	0.796	0.355	0.076	0.015	8.0	1.214	0.430	0.286	0.044
B. S : Starch 2%, added	9.4	0.011	0.808	0.346	0.128	0.011	6.1	1.588	0.342	0.508	0.069
B. Ca+S : $CaCO_3$ 4%+ Starch 2%, added	10.3	0.032	0.720	0.293	0.078	0.009	7.1	1.292	0.412	0.254	0.058
1733-1 (Fukuda Polder, Surface soil)											
C. O : Standard	8.6	0.007	0.346	0.142	0.056	0.002	4.4	1.072	0.237	0.329	0.036
C. Ca+S : $CaCO_3$ 4%+ Starch 2%, added	10.1	0.070	0.358	0.160	0.019	0.008	7.0	0.800	0.167	0.254	0.080
1733-2 (Fukuda Polder, Subsoil)											
D. O : Standard	8.7	0.002	0.406	0.053	0.046	0.004	4.3	0.732	0.061	0.326	0.081
D. Ca+S : $CaCO_3$ 4%+ Starch 2%, added	9.8	0.039	0.253	0.142	0.017	0.007	7.0	0.678	0.167	0.180	0.064

次に各試料を畑状態に incubate する場合，何れに於ても全固形物量と SO_3 は著しく増加するが，$CaCO_3$ 添加試料の SO_3 は無添加試料に比べて低い値を示している．このことは $CaCO_3$ 添加によつて硫化鉄の酸化が抑制されることを意味すると考えられるが，之は可溶性 CaO の量にも亦反映している．即ち CaO は何れも incubation によつて著しく増加するが，その絶対量は各土壌共に $CaCO_3$ 添加試料が無添加試料に比べて却つて低い値を示している．之は土壌の反応の影響も勿論存在すると考えられるが，仮に反応は中性であつても若し incubation 中に $CaSO_4$ を生じているならば当然可溶性石灰として溶出すべきことからみて，$CaCO_3$ 添加の場合は硫化鉄の酸化そのものが無添加の場合に比べて進まなかつたものと解釈する．

置換性塩基の組成に及ぼす硫化鉄の影響

土壌の反応及び可溶性塩類の組成，特にカルシウム塩類の溶解度は土壌の還元と酸化に伴う硫化鉄の変化によつて著るしい影響を受けることを知つた．而して反応及び土壌溶液中の Ca イオンの量の変化は当然置換性塩基の組成にも影響すると考えられるによつて数種の試料につき置換性塩基の定量を行つた．その結果は Table 2 及び Table 3 に示す通りである．

Table 2 Exchangeable Ca and Na in the incubated and leached soils

Soil No. & Treatment	Incubated soils						Leached soils					
	pH (H_2O)	m. e. per 100g soil			Ca/Na	Degree of alkali-zation	pH (H_2O)	m. e. per 100g soil			Ca/Na	Degree of alkali-zation
		Ca	Na	H***				Ca	Na	H***		
1732-2*	7.3	7.69	6.16	0.04	1.25	22.66						
1732-2, incubated**	7.0	7.80	3.88	7.55	2.01	14.28	6.6	6.40	1.90	9.41	3.37	6.99
1732-2, B .O	6.0	8.00	3.17	9.39	2.52	11.66	5.6	4.40	1.07	14.00	4.11	3.94
1732-2, B. Ca	8.0	12.40	2.96	(0)	4.18	10.89	7.4	22.84	0.57	(0)	40.07	2.10
1732-2, B. Ca+S	7.1	13.60	3.41	(0)	3.99	12.55	7.7	23.21	0.79	(0)	29.38	2.91
1733-1*	6.4	3.97	4.65	1.00	0.85	30.96						
1733-1, C. Ca+S	7.0	10.77	1.35	(0)	7.98	8.99	7.6	14.28	0.49	(0)	29.14	3.26
1733-2*	6.8	3.16	3.77	0.30	0.83	29.00						
1733-2, D. O	4.3	2.77	1.16	6.35	2.39	8.92	5.5	2.60	0.53	7.61	4.91	4.08
1733-2, D. Ca+S	7.0	9.95	1.04	(0)	9.57	8.00	7.2	11.03	0.53	(0)	20.81	

* Original soil

** Air-dry soil incubated directly under the condition of the moisture content of field capacity

*** Base exchange capacity − exchangeable bases

Table 3 Exchangeable cations, relative proportion
Equivalent per cent of the base exchange capacity

Soil No. & Treatment	Incubated soils					Leached soils				
	Ca	Mg	Na	K	H	Ca	Mg	Na	K	H
1732-2, Original soil	28.29	38.45	22.66	10.45	0.15					
1732-2, B. Ca	45.62	37.75	10.89	5.74	(0)	84.03	9.79	2.10	4.08	(0)
1732-2, B. Ca+S	50.04	31.60	12.55	5.81	(0)	85.39	6.25	2.91	5.45	(0)
1733-2, Original soil	24.31	38.54	29.00	5.85	2.30					
1733-2, D. O	21.31	16.54	8.92	4.38	48.85	20.00	12.92	4.08	4.46	58.54
1733-2, D. Ca+S	76.54	9.84	8.00	5.62	(0)	84.85	8.22	4.08	2.85	(0)

1　置換性塩基の定量法

置換容量は PURI[5] の炭酸アンモニウム法によつて定量した．原土と若干の処理土の置換容量を比較するに Table 4 に示す如く多少の差は認められるが本定量法の正確度からみて，この程度の差は不可避と考えられるので，本報告では各試料の置換容量は一応原土の夫と同様とみて取扱つた．

置換性 Ca は $CaCO_3$ 無添加試料では常法により醋酸アンモニウム法で定量した．

次に $CaCO_3$ 添加試料の若干について PURI[4] の間接法と HISSINK 法を比較せるに Table 5

Table 4　Base exchange capacity

Soil No. & Treatment	m. e./100g
1732-2, Original soil	27.18
1732-2, B. Ca*	27.30
1733-1, Original soil	15.02
1733-1, C. Ca+S*	15.29
1733-2, Original soil	13.00
1733-2, D. Ca+S*	12.94

* Leached soil

に示す通り両定量値は可なり近似しているので本報告では PURI の間接法による値を採用した．参考として $CaCO_3$ 添加試料の IN 醋酸アンモニウム可溶性の石灰を定量せるに前者に比べて著るしく高い値を示し，残存せる $CaCO_3$ の一部が溶出することが分る．

置換性 Na 及びKは常法により醋酸アンモニウム法で定量し，Mg は PURI の炭酸アンモニウム法を少しく変更[10]して置換性 K+Na+Mg を求め，この値から別に醋酸アンモニウム法で定量した Na+K を控除して求めた．

置換性Hは仮に置換容量から置換性塩基（Ca+Mg+Na+K）の合量を控除した値を以て示した．従つて $CaCO_3$ 添加試料ではこの値は計算上Oとして示されている．

Table 5　Exchangeable calcium
(m.e. per 100g soil)

Soil No. & Treatment	Hissink's method	Puri's method	Soluble in IN ammonium acetate
1732-2, B. Ca*	12.40	12.40	
1732-2, B. Ca**	24.40	22.84	57.40
1733-2, D. Ca+S*	10.00	9.95	
1733-2, D. Ca+S**	13.80	11.03	47.40

* Incubated soil　　** Leached soil

上記の定量法は，特に $CaCO_3$ 添加試料においては必ずしも正確とは考えられず，尚検討の余地の多いことを認める．而して $CaCO_3$ を含む塩成土壌の置換性塩基の定量法は未だ確立されていないので一応の傾向を知る目的で本定量法を採用した．

2　実験成績及び論議

1732—2 試料を用いて風乾原土を直接畑状態で incubate せる場合と，之を湛水下に放置せる後畑状態に incubate せる場合を比較するに，共に原土に比べて置換性 Ca は僅に増加し，Na は約半減し，Hは著しく増加した．その結果 Ca/Na 率は増大し，PURI[1] のアルカリ化率は低下するがその傾向は特に標準試料（1732—2，B. O）の場合に顯著である．尚置換性 Ca の増加は可溶性 CaO の増加によつて Ca 置換が一部生じた結果と考える．

次に同土壌に $CaCO_3$ 或は更に澱粉を添加した試料の incubate 後の置換性塩基をみるに，置換性 Ca は著るしく増加して置換容量の約50％に迄増大した．他方 Na は無添加の場合と同じ程度に減小し，Kも原土の約1/2に減少し，Mg は僅に減少するに止つた．

次に1733試料についてみるに標準試料（1733—2，D. O）に於ては incubation により各置換性塩基は原土に比べて減少するが特に Mg と Na の減少が著るしい．之は incubation によつて pH 4.3 の強酸性土壌に変じ，置換性Hが著るしく大となる結果である．他方 $CaCO_3$ 及び澱粉添加試料では incubation 中における Ca 置換は1732試料に比べて一層進行し，Na は原土の1/3以下に減少した．1733—2，D. Ca+S 試料では置換性 Mg は著るしく減少するがKには大差を生じなかつた．

溶脱過程中に於ける塩基の溶出状態と置換性塩基の変化

硫化鉄を含有する干拓初期の土壌に炭酸カルシウムを添加して incubate する場合，土壌溶液

中の Ca イオン濃度の増加する一方 Ca 置換が可なり進行することは上記の通りであるが，次にかかる土壌が自然界に於て雨水及び灌漑水による溶脱作用を蒙る場合，土壌中の塩基が如何に流亡するか，或はかかる過程中に塩基置換が如何に進展するかを究明した．

1 実 験 方 法

畑状態で incubate せる各試料の20g をブフナー漏斗に採り，炭酸（CO_2）として 100 c.c. 当り 20mg を含有する炭酸水を用いて浸出処理を行つた．即ち毎回 250 c.c. の炭酸水にて浸出濾過し，この操作を5回反複した．然る後各浸出液につき CaO, MgO 及び SO_3 を定量した．次に浸出処理を終つた試料の一部につき置換性塩基の定量を行つた．

2 実験成績及び論議

(1) 溶脱過程中における塩基の溶出状態

各浸出液につき CaO, MgO 及び SO_3 を定量した結果は Table 6 及び Table 7 に示す通りである．

Table 6　Total losses of CaO, MgO and SO_3 in leachates
(mg. per 100g soil)

Soil No. & Treatment	CaO	MgO	SO_3
1732-2, incubated	51.25	103.53	265.83
1732-2, B. O	52.93	166.15	727.50
1732-2, B. Ca	213.42	133.84	260.34
1732-2, B. Ca+S	503.16	217.87	329.28
1733-1, C. Ca+S	377.14	140.20	300.00
1733-2, D. O	52.37	80.65	401.31
1733-2, D.Ca+S	706.63	105.32	205.94

石灰の溶出状態　$CaCO_3$ 無添加の各試料（1732—2, incubated；1732—2, B. O；1733—2, D. O）においては石灰は第1回目の浸出液中に全溶出量の60～90%が溶出するが，特に強酸性を呈する標準試料では第1回目の溶出量は80～90%で著しく多い．第2回～第5回の各浸出液中の CaO の量は大差なく且つ何れも第1回目の溶出量に比べて著るしく少い．倘1732試料及び1733試料の原土中の10% HCl 可溶性の CaO は夫々 0.42 %及び 0.54 %であるが，全溶出量は何れも土壌 100g 当り 50mg 内外で，従つて 10% HCl 可溶石灰の約10%内外が5回の浸出処理中に溶出したことが分る．

次に $CaCO_3$ 添加試料（1732—2, B. Ca；1732—2, B, Ca+S；1733—1, C. Ca+S；1733—2, D. Ca+S）についてみるに第1回の溶出量は 1732—2, B. Ca 試料を除き何れも前記の無添加試料に比べて数倍を示した．且つ第2回～第5回の各溶出量も可なり多く，全溶出量は無添加試料の大凡4～14倍の多きに達した．倘全溶出量は同一試料間でも可なりの差を生じ 1732—2, B. Ca 試料では 100g 当り 213.42mg と 508.57mg の差を生じたが之は浸出速度に起因すると推定される．即ち本実験に於ては浸出速度は略均一になるように調節したが試料によつて浸出速度に可なりの差を生じ，このことが溶出量に相当の差を生じたものと考える．

苦土の溶出状態　$CaCO_3$ 無添加試料に於ては第1回目の浸出液中の MgO は CaO の2～5倍に達して著るしく多く，且つ全溶出量も CaO に比べて高い値を示している．このことは海面干拓地土壌中には可溶性のマグネシウム塩類の可なり多いことを意味し，このことが置換性 Mg の定量を困難ならしめる．筆者等が Mg の定量に間接法を用いたのもこのためである．次に浸出過程中における MgO の溶出状態をみるに $CaCO_3$ 無添加試料では前記 CaO の場合と同様の傾向を示し，第2回～第5回の各溶出量は第1回目の量に比べて著るしく少く，この傾向は特に強

Table 7　Successive and total losses of CaO, MgO and SO_3 in leachates

m. e. per 100g soil

Component	Successive losses					Total losses
	1st	2nd	3rd	4th	5th	
1732-2 B. O (Standard)						
CaO	1.41	0.12	0.10	0.16	0.10	1.89
MgO	7.53	0.10	0.15	0.26	0.21	8.25
SO_3	16.53	0.48	0.29	0.53	0.34	18.17
1732-2 B. Ca ($CaCO_3$ 4% added)						
CaO	1.78	1.48	1.46	1.36	1.54	7.62
MgO	2.25	1.57	1.12	0.89	0.81	6.64
SO_3	5.46	0.30	0.30	0.23	0.21	6.50
1732-2 B. Ca+S ($CaCO_3$ 4%+Starch 2% added)						
CaO	4.60	3.56	3.56	3.46	3.13	18.31
MgO	4.85	1.75	1.52	1.43	1.25	10.80
1732-2 Incubated, directly						
CaO	1.12	0.21	0.18	0.17	0.15	1.83
MgO	3.74	0.39	0.37	0.33	0.30	5.13
1733-2 D. O (Standard)						
CaO	1.60	0.08	0.07	0.07	0.05	1.87
MgO	3.79	0.09	0.07	0.04	Tr	3.99
1732-2 D. Ca+S ($CaCO_3$ 4%+Starch 2% added)						
CaO	7.33	5.43	4.72	3.82	3.90	25.20

酸性の標準試料で顯著に現われ，後者の場合は第1回目に全溶出量の90%以上が溶出した．之に対して中性反応を示す $CaCO_3$ 添加試料では第1回目の溶出量は前記の標準試料に比べると稍々少いが第2回目以後も，回の進むに従つて絶対量は減少するが毎回可なりの量が継続的に溶出した．尚全溶出量は試料間に差があつて必ずしも一定でないが，概して $CaCO_3$ 添加試料において全溶出量が増大する傾向が認められる．Ririe, Toth 及び Bear[(6)] も Norton 土においては石灰質肥料の施用は苦土の損失を増大すると報じている．

硫酸の溶出狀態　1732—2 標準試料の第1回目の溶出量は $CaCO_3$ 添加試料に比べて著しく多いが第2回～第5回の各浸出液中の溶出量は両試料間に大差を認めない．

次に全溶出量をみるに 1732 及び 1733 の両土壌共に標準試料が特に高い値を示し，$CaCO_3$ 添加試料では其の1/2～1/3 に過ぎない．このことは前に述べた通り，$CaCO_3$ の添加が硫化鉄の酸化を抑制することを示している．

溶出塩類の形態　標準土（1732—2，B. O）の第1回目の浸出液においては CaO+MgO に比べて SO_3 は著しく多いが，之は Ca 及び Mg が硫酸塩として溶出する以外に硫化鉄の酸化生成物，主として硫酸鉄も溶出することを示している．而して第2回目以後の浸出液では CaO+MgO と SO_3 の値は可なり近似し，従つて Ca 及び Mg は主として硫酸塩の形で溶出すると推定される．之に対して $CaCO_3$ 添加試料では第1回目の浸出液中の CaO+MgO と SO_3 は近似値を示すに対し，第2回目以後においては SO_3 は CaO+MgO に比べて遙かに僅少である．従つて Ca と Mg は第1回目は主として硫酸塩として溶出するが，第2回目以後は硫酸塩以外に重炭酸塩の形でも溶出するものと推定される．

全溶出量の比較においても標準土では SO_3 の当量値は CaO+MgO の夫の約2倍量を示すに対し，$CaCO_3$ 添加土では反対に CaO+MgO の当量値は SO_3 の夫の2倍若しくはそれ以上の値を示している．

（2）溶脱に伴う反應及び置換性塩基の変化

溶脱後の各試料の反応及び置換性塩基の定量結果は Table 2 及び Table 3 に示す通りである．

反　應　$CaCO_3$ 無添加試料中で incubate 後の土壌の反応が中性及び微酸性を呈する試料（1732—2，incubated；1732—2，B. O）に於ては溶脱後の pH 価は稍々低下するが，incubate 後強酸性に転じた1733—2，D. O 試料では pH 価は却つて増加した．後者の場合は incubation によつて生成せる酸性物質，特に遊離硫酸が溶脱過程中に洗流された結果と推定される．之に対して $CaCO_3$ 添加試料では1例を除き溶脱後は pH 価が僅かに増大する傾向を示し，各試料共に微アルカリ性を呈した．

置換性塩基　$CaCO_3$ 無添加試料（1732—2，incubated；1732—2，B. O；1733—2，D. O）についてみるに，何れも溶脱後は原土は勿論のこと，incubate 直後の試料に比べて夫々置換性 Ca 及び Na は減少し，特に Na においてこの傾向が大である．他方置換性Hは著しく増加し，塩基飽和度は低下した．

次に $CaCO_3$ 添加試料においては置換性 Ca は incubate 直後の試料に比べて著るしく増加し，略置換容量の85%に迄高上し，溶脱過程中に Ca 置換が著るしく進行することを示している．之に対して置換性 Na は incubate 直後の試料に比べて夫々減少するが，特に1732試料では前記の標準土に比べて Na は更に減少したが，1733試料では両試料間に大差を認めなかつた．この結果 $CaCO_3$ 添加試料の Ca/Na 率は 20～40 の値に達した．次に置換性 Mg は原土に比べると各試料共に著るしく減少するが之を incubate 直後の試料と比較する場合，1732試料では更に顯著に減少したが，1733試料では僅に減少する程度に止つた．置換性K も原土に比べると概して約半減したが，incubate 直後の試料との間には大差を示さず，溶脱過程中におけるK置換は比較的少いことを知つた．

考 察 及 び 結 論

二硫化鉄を含有する児島及び福田の両干拓地の風乾土を直接若しくは一度湛水状態に放置せる後畑状態に incubate する場合，何れも pH 価は低下し，之に伴つて可溶性硫酸塩と石灰は増加した．又各試料の反応及び置換性塩基は incubation 及び其後の浸出処理により何れも変化したが，その状態は土壌の種類及び前処理の方法によつて可なりの差異を生じた．

児島干拓地の重粘土（1732試料）を直接畑状態に incubate する間に，更に炭酸水での浸出過程中に pH 価は僅ではあるが次第に低下し，置換性カチオンの中 Na は減少する一方Hは著し

く増加するが，その増加量よりみてMg及びKの一部も亦Hで置換されることが分る．之に対して置換性 Ca の変化は余り著しくなく，incubation 直後は却つて僅に増加するが，之は土壌溶液中の Ca イオン濃度の増加によつて Ca 置換が一部進行することによると考えられる．而して浸出処理後は Ca は僅か乍ら減少した．

同一土壌を湛水後 incubate すると弱酸性に転じ，置換性カチオンの中 Ca は僅に増加し，Na は原土の約1/2に減少し，Hが著しく増すことは前の場合と同様である．而して浸出処理後のpH価の低下，各置換性塩基の減少は前の場合に比べて一層甚しく，その結果塩基飽和度も約50％に迄低下した．incubation によつて強酸性に転ずる幅田土壌（1733試料）に於ては pH 価の著るしい低下に伴つて置換性塩基は何れも減少し，塩基飽和度も約50％に迄低下した．然るに本試料は其後の浸出処理によつて pH 価はむしろ増大するが，之は前記の如く硫化鉄の酸化生成物が洗除されることに基くと考える．塩基飽和度は浸出処理によつて僅に低下するが置換性塩基の組成には著るしい変化を生じないことを知つた．

予め $CaCO_3$ を添加せる試料においては，incubation 後の土壌の反応は略中性に近い値を示し，土壌溶液中の Ca イオン濃度は無添加試料に比べて却つて低い値を示すが，incubation 中における Ca 置換は前者の場合に比べて著るしく進展した．その結果置換性 Na は減少し，Mg 及びK も試料によつては可なり減少した．かくて Ca/Na 率は原土に比べて顯著に増加し，アルカリ化率は原土の 1/2～1/4 に低下した．

本試料は浸出処理によつて反応に顯著な変化を生ぜず，pH 価はむしろ僅か乍ら増大する傾向すら示した．而して浸出過程中においての Ca 置換は更に著るしく進展し，浸出後の Ca 飽和度は約85％に迄高上した．之に対して Mg 及び Na は更に減少したが浸出後においても置換複合体は略塩基で飽和の状態を示した．

土壌の塩基置換反応は周知の如く質量作用の定律と化学平衡理論に従つて進行する．incubation 中における土壌溶液中の Ca イオン濃度の増加に伴つて Ca 置換も一部進行するが置換浸出された Na イオン濃度が一定限度に達すれば反応速度は次第に減少して遂には平衡状態に達し，Ca 置換はそれ以上は進展しない．然るに浸出処理を行う場合，各浸出液中に毎回相当量の石灰の溶出すること，即ち溶液中の Ca イオン濃度の高いことは質量作用の定律よりして Ca 置換の進展に好条件であるが，更に置換浸出された Na 及び Mg イオンが浸出過程中に反応系外に除去されることは一層 Ca 置換を促進する結果となる．かかる理由によつて浸出処理後の試料の Ca 飽和度が incubate 直後の試料に比べて遙かに高い値を示すに至る．

HISSINK[3] 及び ZUUR[8] は $CaCO_3$ を含む重粘なるオランダの干拓地土壌に於ては，表土の乾燥に伴つて亀裂を生じ，雨水は土壌中に滲透して所含塩類は洗除されるが，他方空気が土壌中に滲入して好気的状態の発達するに伴つて二硫化鉄は酸化されて Fe_2O_3 と H_2SO_4 に変化し，その結果 $CaCO_3$ は水溶性の $CaSO_4$ と $Ca(HCO_3)_2$ に変化し，かくて Na-Mg 粘土は Ca 粘土に転化すると報じている．且つかかる過程によつて塩基置換が如何に進展するかの実例を次表の如く示している．

	Ca %	Mg %	Na %	K %
干拓直後	17	35	39	9
干拓後7年目	82	10	2	6

同じくオランダの干拓地に於ても既に $CaCO_3$ を失つたか或は之を含有していなかつた土壌においては過去に集積せる二硫化鉄は排水後酸化生成物として硫酸及び硫酸鉄を生じ，之が CaCC₃ によつて中和されないために所謂 cat clay と呼ばれる強酸性土壌を生じ，海岸の沿岸地帯の土

地改良上，最も困難な問題の一つであることを EDELMAN[2] 及びZUUR[8] は指摘している．

筆者等の実験に於ても Table 3 に示す如く，予め $CaCO_3$ を添加しておく場合は湛水後の incubation 中における好気的状態の発達と其後の溶脱作用とによつて Ca 置換が進展して，上記のオランダの干拓地土壌の場合と略同様の結果を示した．之に反して $CaCO_3$ を添加することなく湛水試料を incubate する場合は試料によつては強酸性土壌に転ずることを知つた．事実自然状態に於ても此種の強酸性土壌が，児島干拓地の堤塘に沿つた湿地や四国周辺及び瀬戸内海沿岸の海岸沿いの塩害地の水田に広く分布することは既に報[9, 11, 13] じた通りである．

次に浸出処理中における塩基の溶出状態にも試料によつて明確な差異を生じ，$CaCO_3$ 無添加試料では第1回目の浸出液中に Ca 及び Mg の大部分が溶出して第2回目以後は溶出量が急減するに対して $CaCO_3$ 添加試料では Ca 及び Mg の可なりの溶出が毎回，継続的に進行すること，前者に於ては溶出する Ca 及び Mg の大部分が硫酸塩の形をとるに対して後者の場合は之に加えて重炭酸塩としても相当量が溶出することを認めた．

HISSINK[3] は海中に沈積せる含塩粘土堆積物は泥状構造と云うよりはむしろ構造を全く欠いて居り，之が良好なる構造を形成するには次の2過程，即ち物理的に土壌が乾燥することと化学的に置換性 Na 及び Mg の大部分が Ca で置換される必要あることを強調している．本実験において石灰に乏しい児島干拓地土壌では予め炭酸カルシウムを添加する場合干陸後の好気的状態の発達と溶脱過程中に可溶性の石膏及び重炭酸石灰を生じて置換性 Na 及び Mg の可なりの部分が Ca で置換されることを認めたが，このことは重粘なる干拓地土壌の物理的性質の改良上，極めて意義が深い問題と考える．

引　用　文　献

1) ASGHAR, A. G., PURI, A. N., and TAYLOR, E. M. (1936), Chem. Abst., 30 : 3137.
2) EDELMAN, C. H. (1952), Soil Sci., 74 : 15～20.
3) HISSINK, D. J. (1938), Soil Sci., 45 : 83～94.
4) PURI, A. N. (1935), Soil Sci , 40 : 159～163.
5) PURI, A. N. (1935), Soil Sci , 40 : 249～253.
6) RIRIE, D., TOTH, J., and BEAR, E. (1952), Soil Sci., 73 : 23～36.
7) de' SIGMOND, A. A. J. (1927), Calif. Agr. Exp. Sta. Sp. Pub.
8) ZUUR, A. J. (1952), Soil Sci., 74 : 75～90.
9) 米田茂男，川田登 (1953)，岡山大学農学部学術報告 No. 2 : 8～18.
10) 米田茂男 (1953)，岡山大学農学部土壌肥料学教室報告 No, 1.
11) 米田茂男，川田登 (1954)，土肥誌., 24 : 325～328.
12) 米田茂男，川田登 (1954)，土肥誌., 25 : 36～40.
13) 米田茂男，下瀬昇，川田登 (1954)，岡山農試臨時報告 No. 49 : 1～9.
14) 米田茂男，池葉須末明 (1954)，土肥誌., 25, Supplement No. 1 : 30.

薄荷の育種学的研究 第4報

オランダハッカ及びこれと日本薄荷とのF1の細胞遺伝学的研究*

池田長守・宇渡清六

Studies of Mint Breeding IV

Cytogenetical studies on *Mentha spicata* L. *var. crispa* Benth. and the F_1 hybrids which involve *M. spicata* L. *var. crispa* Benth. and *M. arvensis* L. *var. piperascens* Mal.

Nagamori Ikeda and Seiroku Udo

Mentha spicata L. *var. crispa* Benth. is now wildly spread in Japan, but it is said to have been introduced into this country from Europe about one hundred years ago. *Mentha arvensis* L. *var. piperascens* Mal. (Japanese mint) is cultivated in Japan and China, and its home is supposed to be the Far East. In this paper, the authors tried to guess the phylogenetic relationships between them by means of the F_1 hybrids raised, as one of the fundamental studies of mint breeding.

Five lines of F_1 hybrids were raised in 1954. They were all vigorous growers and did not differ in the reciprocal crosses. Among the F_1 characters, such as inflorescence shape, leaf shape, habit of runner, flavour of the essential oil in thf leaf etc., some were intermediate, others patroclinous or matroclinous, but as to the quantitative characters, such as plant height, date of flowering, size of leaf, colour of flower etc., F_1 lines varied one another.

Anthers in 4 F_1 lines became atrophied and in one F_1 line [92], about 73% of anthers were completely developed. But no fertile pollen was found in the pollensac in any of the F_1 lines. Fertility of each F_1 was nearly zero either by open pollination or by backcross to parents. About 4100 flowers were tested and only 12 seeds were obtained, 10 of them being the ones set on the [92] line.

As the authors previously reported, 48_{II} chromosomes are found at MI of the reduction divisions of the Japanese mint, and all the processes of the reduction divisions proceed regularly.

In *M. spicata var. crispa*, the heterotypic and the homotypic divisions of PMC's proceeded regularly, and 24_{II} and 24_{I} chromosomes were observed in the MI and MII respectively. In AII, however, chromosomes were distributed irregularly and normal tetrads occured only in 49% of the case observed. This is the reason why the fertility of this species are low. Because of the irregularity of the reduction division

* 本研究の要旨は昭和29年11月，日本育種学会第7回講演会において発表.

in PMC's, it is supposed that the formation of this species has been recent and interspecific crosses have occurred in the course of the species formation, and this species does not yet attain to the stable equilibrium.

The number of chromosomes of each F_1 was found to be 72 when examined in root-tip cells. Reduction divisions of PMC's were observed in the line〔92〕. At MI 3～10 bivalent chromosomes were found, the mode being 6. Other chromosomes were all univalent. Pollen-tetrads degenerated thoroughly. Consequently the authors suppose that the parental two species of *Mentha* are far off phylogenetically each other.

I. 緒　　言

日本薄荷はわが国各地で薄荷脳を採る目的で栽培される．中華人民共和国においても南京，上海間の楊子江沿岸に集団栽培地がある．欧洲産の arvensis の染色体数が 2n＝72[3, 9] であるのと異り，日本薄荷のそれは 2n＝96[4] であつて，系統を異にし，極東原産と考えられる．オランダハッカもわが国諸地の水辺，湿地に自生しており，2n＝54 の系統と，2n＝48 の系統とがある[5]．本実験の交雑親は後者である．オランダハッカは徳川末期の文献[3, 7] によると，その頃舶来したものである．白井光太郎 (1929)[10] は「南欧及カナリヤ島に自生す」とするが，Hegi 等 (1914)[2] や Bentham (1865)[1] は本種を記載していない．従つて原産地は欧洲と想像されるが詳でない．筆者等は薄荷育種の基礎として，種間の類縁関係を知り，又育種素材育成の目的をもつて，研究を行つているが，玆には上記両種の種間雑種 F_1 の，形態的，生理的諸特性並びに核学的観察の結果から，両種間の類縁関係を推定し，又両親の一方オランダハッカの PMC の成熟分裂の観察結果を報告する．

本文に入るに先立ち，実験結果について批判，御教示をいただいた京都大学農学部香川冬夫教授，核学的観察その他に就いて有益な助言を賜わつた岡山大学理学部大倉永治教授，又実験資料を供与された農林省農業技術研究所西村米八技官に対して深甚の謝意を表する．尚研究費の一部は文部省の科学研究助成補助金によることを感謝をもつて附記する．

II. 実験材料及び方法

本実験の交雑親は，西村技官が旧農林省倉敷農事改良実験所（現在岡山県立農業試験場倉敷分場）より取寄せたものである．交雑は昭和 26 (1951) 年の夏，西村氏によつて鴻巣において行われ，種間雑種 F_1 の 5 系統がその両親と共に昭和 28 (1953) 年筆者等の研究室へ譲渡された．両親の起原及びその F_1 との関係は次の如くである．

〔4〕*	交雑親，オランダハッカ	
〔87〕〔88〕〔89〕	F_1	〔95〕×〔4〕
〔91〕〔92〕	F_1	〔4〕×〔93〕
〔93〕	交雑親，日本薄荷　品種「赤茎」の自殖実生	
〔95〕	交雑親，日本薄荷　品種間雑種（白花×青茎）の F_1，本系は昭和27年枯死	

脚註．文献(7)には次の如く記述されている．「天保10年の頃，阿蘭陀種の薄荷舶来す．形容尋常の者に似て，肥大にして葉に皺文多し．その気甚猛烈にして悪臭を帯ぶ．葉に蔕なくして直に茎に対生す．尋常の薄荷の葉蔕五六分なるに異なり．移し栽て繁茂し易し．故に今諸処に多し．」と．併し文献(3)に至つて初めてオランダハッカの名称を用う．又文献(10)には本種の来歴として「南欧及カナリヤ島に自生す．日本へは文政年中，宇田川玄真，大槻玄沢の建言により和蘭陀より盆栽を取寄せて移植せしより此物あり」とあり．

* 〔 〕内の番号は本研究室登録系統番号

体細胞染色体の観察には前報[5]に示した根端押つぶし法を用い，花粉母細胞では生の材料及びクロロホルムを含まないカルノア液で固定保存した材料を醋酸カーミンで染色，なすりつけ法を用いて観察した．

Ⅲ．観察結果及び考察

（1）営養器官の外部形態

F_1 の外観は何れを父とし或は母としても変りなく，凡そ両親の中間であつた．即ち，オランダハツカの葉は明るい黄緑色で，葉脈深く，皺多く，葉縁が波状に波打つているが，日本薄荷の葉は灰色がかつた緑色を呈し，皺無く平坦である．F_1は葉の色，皺の量は中間，葉縁は波打つておらず，外観は日本薄荷に近い．葉基，葉柄はオランダハツカでは心脚，無柄，日本薄荷では鋭脚，有柄，F_1 はその中間で円脚，短柄である．日本薄荷の花序は輪繖花序で，花房が茎の半ば以上の部分の葉腋から腋出しており(第1図)，オランダハツカでは，あまり長くない，花の密生した，円柱状の穂状花序が，梢頭，枝端に頂生している（第2図）．F_1 では下部の花房は葉腋から腋出しているが，その葉は梢頭に進むに従つて短小となり，遂に線状の苞となつて梢端は穂状に終り，花序の形態は中間型をとる（第3，4図）．併し詳細に観察するとF_1系統同志の間にも形質の相違が見られる．例えば毛の量（日本薄荷は微毛が密生している．オランダハツカは無毛）は F_1 の系統によつて両親間の種々の段階を示す．葉の大きさも系統間の変異が著しい．茎の花青素による着色は，父本日本薄荷〔93〕，母本オランダハツカ〔4〕は共に濃いが，そのF_1〔91〕〔92〕は殆んど着色していない．然るに逆交雑の F_1〔87〕〔88〕〔89〕は地際から先端まで濃色に着色している．この母本〔95〕の両親品種なる白花，青茎ともにアントキアンによる着色は殆んどない．これには複雑な遺伝子関係が想像される．花色は〔93〕は淡紫色，〔4〕は白色，F_1 の中〔91〕〔92〕はその中間，F_1 の残り〔87〕〔88〕〔89〕は一層淡色であつて，〔4〕に近い．此れは〔95〕の親の一方，白花種の花色の影響かと考えられる．

（2）生　育　状　況

F_1 は何れの系統も旺盛な発育を遂げてヘテローシスを示し，種間雑種に屢々見られる萎縮，畸形を示さない．併し草丈は系統によつて異り，或る系統では 125cm に達するが，他の系統では 70cm にも達しない（第1表）．

Table 1. Some characters of parental species and F_1

Line no.	Species	Plant height in cm	Date of flowering
93	*M. arvensis* L. *var. piperascens* MAL.	85.7	28, July
87	F_1 *arvensis*×*spicata*	123.5	28, July
88		66.7	28, July
89		103.3	14, July
91	F_1 *spicata*×*arvensis*	66.9	20, July
92		82.3	3, July
4	M. *spicata* L. *var. crispa* BENTH.	88.9	20, July

（3）生 理 的 性 質

開花期は F_1 の系統によつて可なりの差が見られた．即ち3つの系統では凡そ両親と大差なく7月末に開花し，他の2つの系統では両親の何れよりも早く7月上，中旬に開花を見た．薄荷属の種は茎葉に精油を貯え，それぞれの香をもつ．オランダハツカの茎葉は特有の不快臭を持ち，日本薄荷の茎葉にはメントールの芳香がある．F_1 の香は前者に近い．繁殖茎の習性は両親種間に大差がある．即ちオランダハツカでは匍匐茎が地上を伸び，先端上向し，暖地では葉を着けたまま越冬するが，日本薄荷では地下茎となつて地下に潜る．F_1 の匍匐茎は地際を走り，秋末先端が地中に入る．

（4）完全葯の出現率

薄荷属の花には4雄蕊があつて，花絲は花冠上に長く抽出し，先端に紫色の葯を着ける．かかる葯を完全葯と称する．併し種々の条件によつて4本の葯が必ずしも皆完全に発達する訳ではない．完全葯の出現率は，その年の或は栽植場所の外界条件によつて影響を受ける．又植物体が老衰し，或は秋季温度が降下するに従つて出現率も低下するのが常である．醋酸カーミンに染まる所謂稔性花粉は，完全葯の葯嚢中にのみ存在するから，その出現率は種の遺伝的性質たる稔性とは一層密接な関係にあることがわかる．本雑種両親の完全葯出現率は盛夏好条件の下で，何れも85％以上の高率を示す．然るに F_1 では完全葯は全くなく，花絲は何れも短く，葯は花筒中にとどまり，白色乃至黄褐色で萎縮している．但，〔92〕では73％に及ぶ高率の完全葯を持つ（第2表）．

Table 2. Frequency of completely developed anthers

Line no.		No. of completely developed anthers in one flower					Total		% of completely developed anther
		0	1	2	3	4	Anthers	Flowers	
P	93	0	0	0	2	94	382	96	99.5
F_1	87	no anther, completely developed							0
	88								0
	89								0
	91								0
	92	21	4	4	16	48	273	93	73.4
P	4	1	3	10	21	62	334	97	86.1

Note : Calculated in the 1st week of the August, 1954

（5）花粉稔性及び種子稔性

醋酸カーミンに染まる花粉をもつて稔性花粉と仮定するならば，両親の稔性花粉率は高く，いずれも80％に達する．然るに F_1 では葯の萎縮している4系統は勿論，73％の完全葯を有する〔92〕においても，葯の中には小さい，内容空虚な，従つて醋酸カーミンに染まらない不稔花粉のみを含み，稔性花粉は全く見られない（第3表）．

薄荷属の花は子房中に4胚珠を蔵する．得られた種子の数を全胚珠数（花の数の4倍）をもつて除し，之を百倍して種子稔性（％）とする．放任の場合，両親は何れも約50％の種子稔性を示すのに，F_1 では全く種子が得られなかつた．又 F_1 を両親に戻交雑した場合の種子稔性も殆んど零に近かつた．但〔92〕は前者で0.18％，後者で0.6％及0.19％の種子稔性を示した（第4，5表）．

Table 3. Pollen fertility determined by acetocarmine staining

Line no.	No. of pollens			Pollen fertility
	Fertile	Sterile	Total	
93	242	61	303	79.87
Each F_1	no fertile pollen found			0
4	611	126	737	82.90

Table 4. Seed fertility by open pollination

Line no.		No. of flowers tested	No. of seeds aquired	Seed fertility (%)
P	93	506	959	47.4
F_1	87	521	0	0
	88	508	0	0
	89	595	0	0
	91	497	0	0
	92	680	5	0.18
P	4	341	759	55.7

Note : Seed fertility $= \frac{\text{no. of seeds aquired}}{4 \times \text{no. of flowers tested}}$ as one flower contains 4 ovules.

Table 5. Seed fertility of F_1 by backcross

Line no.	Backcross	No. of flowers tested	No. of seeds aquired	Seed fertility (%)
88	to *arvensis*	150	0	0
89		75	0	0
91		286	1	0.09
92		130	1	0.19
88	to *spicata*	74	1	0.34
89		47	0	0
91		418	0	0
92		168	4	0.60

(6) 細胞学的観察

(i) オランダハッカ (図6—11)

日本薄荷の PMC の成熟分裂は規則正しく 48_{II} を示す事は前報[6] に述べた. オランダハッカの PMC の成熟分裂も規則正しく, M I において 24_{II} が, 又 M II において 24_{I} が数えられた. 然る

にＴⅡになると，染色体は不規則に分配されて4核以外に，5核，3核或は少数染色体を含む多核細胞が認められた．従つて花粉4分子も比較的異常が多く，2分子から7分子に至る種々のものが観察され，正常の4分子は49％に過ぎなかつた（第6表）．このように正常4分子が50％に充たないのに，花粉稔性が83％に達するのは，一見矛盾している．併し後者の数字は，実際花粉を発芽させて得た結果ではなく，醋酸カーミン染色による認定である．それ故正常花粉以外に，正常に近い染色体構成を持つ花粉も醋酸カーミンに染まると考えれば説明できる．例えば第6表において，完全4分子の外に3分子＋1小核，3分子，4分子＋1小核及び5分子の正常の細胞が外観上完全な花粉に発達して醋酸カーミンにある程度染まり，正常花粉と判別し難いものと仮定すると，染色する花粉の全花粉に対する割合は約86％となり，第3表に示した花粉稔性とよく一致する．醋酸カーミンに染まる花粉を有効花粉と認定することは，成熟分裂が正常な場合には誤りが少いが，本実験のオランダハツカのように正常に近い染色体構成を持つ花粉（之が正常花粉との競争に打勝つて，受精にあずかることも稀にあつて，かかる場合異数性の子孫を残す）が多い場合には，之等をも包含して過大な数字の出て来る危険があるのではなかろうか．正常な花粉4分子の割合49.1％は完全花粉によつて受精されて結実する胚珠数の全胚珠数に対する割合即ち稔性の55.7％にほぼ一致する．従つて此の事実はEMCの還元分裂の同じ時期にも，PMCの場合とほぼ同様の不規則性の起ることを想像させる．

Table 6. Frequency of various pollen-tetrads of *M. spicata var. crispa.*

Cells constituting pollen-tetrads: No. of normal cells	No. of micro or empty cells	Frequency
2	2	1
3	3	1
3	2	2
3	1	12
3	0	7
4	0	113
4	1	32
4	3	1
5	0	49
5	1	4
5	2	1
6	0	6
7	0	1
Total		230
% of normal tetrad		49.1

結果から見ると殆んど変らない稔性の低下が，日本薄荷では4分子形成後，花粉形成迄の間に起り[6]，オランダハツカでは逆に4分子形成前，特にＡⅡ以後における成熟分裂の不規則性によつて起ることは興味深い．成熟分裂の不規則性はゲノム構成の異る種間或は属間の雑種に見られる現象である．この不規則性が尙残つていることは，オランダハツカは種の分化過程においてゲノムの異る種間の交雑を経，種形成後も日浅く，尙十分なる安定度に達して居ないという推定を可能ならしめる．

(ii) F_1（図12～17）

根端で調査した F_1 の体細胞染色体数は何れの系統においても72であつた．此の数は両親のPMCのＭⅠに現れる2価染色体数の和に等しい．〔92〕系統のPMCの観察結果によると，ＭⅠにおける2価染色体の出現頻度は3～10，モードは6（第7表）であつて，他は全部1価染色体であつた．2価染色体の形態は楕円形が多い．花粉4分子は完全なものは殆んどなく，内容空虚或は萎縮した異常のもののみが観察された．

F_1 のPMCの成熟第1分裂中期において2価染色体数が僅少で，その数に変異の多い事（これは只1系統の観察結果であり，相反交雑の F_1 では多少異なる結果を得ているが，この論拠を

Table 7. Chromosome configurations at MI of PMC of the F_1 line〔92〕

Type	$3_{II}+66_{I}$	$4_{II}+64_{I}$	$5_{II}+62_{I}$	$6_{II}+60_{I}$	$7_{II}+58_{I}$	$8_{II}+56_{I}$	$9_{II}+54_{I}$	$10_{II}+52_{I}$	Total
Frequency	3	4	6	16	10	6	2	1	48

くつがえすものではない）は，両親染色体間に親和性の少いことを示すものである．従つてF_1の花粉稔性，及び種子稔性の零に近い事は当然であつて，両親種，日本薄荷とオランダハツカとの間の類縁関係は可なり遠いものと考えられる．

Ⅳ. 摘　　要

1．オランダハツカと日本薄荷との相反交雑によつて得た種間雑種 F_1 の5系統は，何れも強健で生育旺盛であつたが，草丈，開花期，葉の大きさ，花の色，茎葉の花青素及び毛茸の量等所謂数量的形質に関して，相互間で相違を示した．これらの相違は，2系統の日本薄荷親を用いた事によるとも考えられるが，その変異の巾は日本薄荷内の変異の巾よりも広く，両親にヘテロに存在していたポリジーンの分離，再分配によるものと見るのが至当であろう．又葉及び花序の形態，繁殖茎の習性，茎葉中の精油の香気等，両親種間の本質的相違と考えられる形質は，何れを父とし又何れを母としても変りなく，且，F_1 でほぼ中間性を示した．

2．F_1 中〔92〕を除く他の4系統は葯が全く退化している．これら4系統は勿論，葯の退化していない〔92〕も，葯の中には稔性花粉を全く含んでいない．放任受精の場合も，両親に戻交雑した場合も，F_1 諸系統は殆んど種子を着けない．合計4100個の花を調査して12個の種子を得たに過ぎず，中10個は〔92〕の種子であつた．

3．前報に示した様に，日本薄荷の花粉母細胞減数分裂のMⅠにおいて48_{II}が観察され，減数分裂の全経過は正常である．オランダハツカではPMCの成熟第1分裂から第2分裂中期迄は正常で，夫々24_{II}及び24_{I}の染色体が観察された．然るにAⅡにおいて染色体の不規則な分配が起るため，正常4分子は約49％しか見られない．之が本種の稔性を低める原因であると考える．そのPMCの成熟分裂の不規則性から，本種は種の分化過程において種間交雑を経，種形成後も日尚浅く，安定種に迄は達していないという結論に達した．

4．F_1 の体細胞染色体数は何れの系統においても72であつた．PMCの成熟分裂は〔92〕で調べたが，MⅠにおける2価染色体の出現頻度は3～10，モード6，他は全部一価であつた．又4分子は全く退化していた．これらの点から日本薄荷とオランダハツカとは類縁関係が遠いと推定される．

引　用　文　献

1) Bentham, G. 1865 : Handbook of the British Flora. Vol. 2. London.
2) Hegi, G. Gamo, H. und Marzell, H. 1914 : Illustrierte Flora von Mitteleuropa. V Band.
3) 飯沼慾斎，1856（安政3年）：草木図説．
4) 池田長守，小合龍夫，1954：薄荷の育種学的研究 第1報，岡山県立農業試験場臨時報告，第49号．
5) 池田長守，宇渡清六，1954：薄荷の育種学的研究 第2報，岡山大学農学部学術報告，第4号．
6) 池田長守，小西猛郎，1954：薄荷の育種学的研究 第3報，岡山大学農学部学術報告，第5号．
7) 小野蘭山撰，梯南洋増補重刻，1844（弘化元年）：重修本草綱目啓蒙．

Fig. 1. *M. spicata* L. *var. crispa* BENTH. (×1/3)

Fig. 2. *M. arvensis* L. *var. piperascens* MAL. (×1/3)

Fig. 3. F_1 [92] (×1/3)

Fig. 4. F_1 [89] (×1/3)

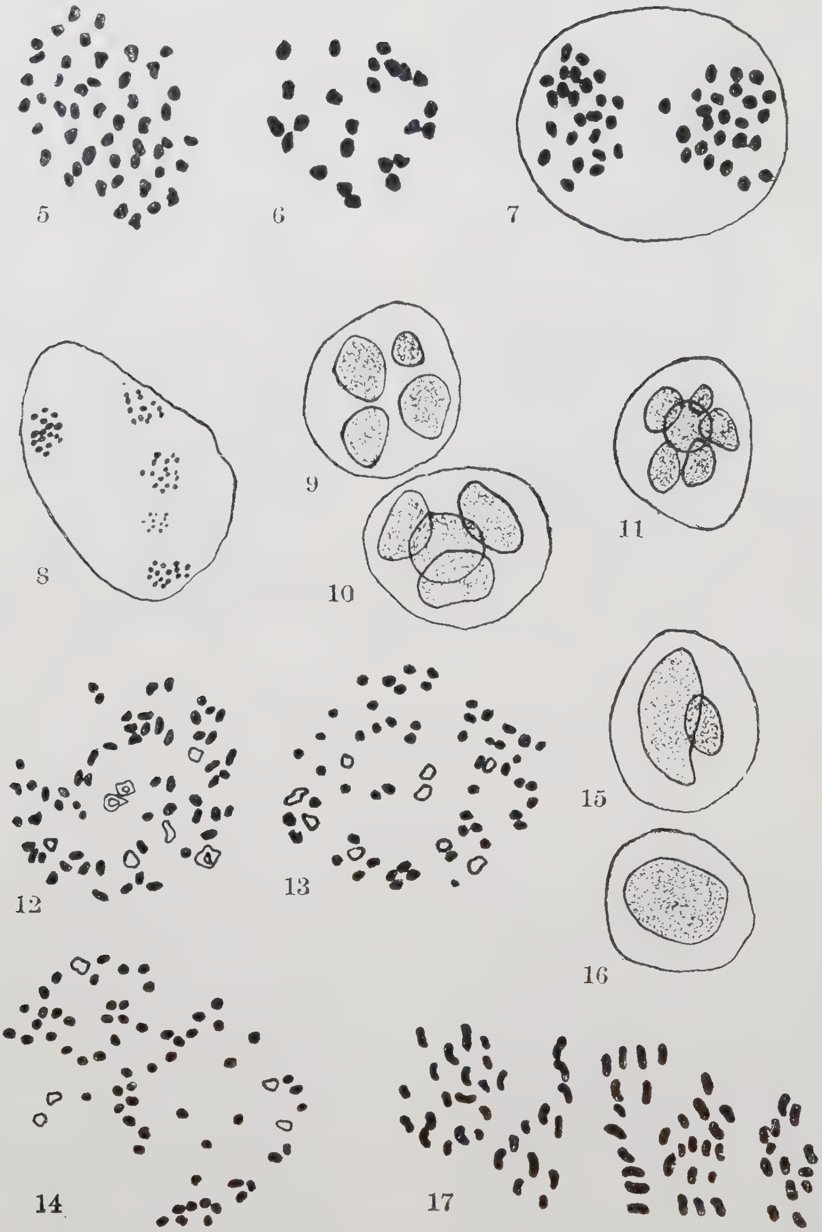


Fig. 5. MI in PMC's of *M. arvensis var. piperascens*, 48_{II} ×1800

Fig. 6∼11. Meiotic figures in PMC's of *M. spicata var. crispa.*

6. MI, 24_{II} 7. MII, 24_{I} 8. Irregular distributions of chromosomes in TII ×1800 9∼11. Pollen-tetrads ×1100

Fig. 12∼14. MI in PMC's of F_1 [92] ×1800

12. $7_{II}+58_{I}$ 13. $9_{II}+54_{I}$ 14. $5_{II}+62_{I}$

Fig. 15∼16. Degenerated pollen-tetrads of F_1 [92] ×1100

Fig. 17. Somatic plate of F_1 2n=72 ×2500

8) Ruttle, M. L. 1931 : Cytological and embryological studies on the genus *Mentha*. Gartenbau-wiss. 4.

9) Schuerhoff, P. N. 1929 : Zytologische und genetische Untersuchungen an *Mentha*. und ihre Bedeutung für die Pharmakognosie. Arch. Pharm. u. Ber. dtsch. Pharm. Gesel. 267.

10) 白井光太郎，1929：植物渡来考，東京.

人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究

(3). 牡牛精液に於ける Hyaluronidase の分布・及び添加 Hyaluronidase 製剤の精子による吸着

和田　宏・湯原正高

Studies on Hyaluronidase in the Artificial Insemination.

(3) Distribution of Hyaluronidase in the Bull Semen and Absorption of Added Hyaluronidase preparation by Spermatozoa.

Hiroshi Wada and Masataka Yuhara

(1) This studies were carried out to investigate distribution of hyaluronidase in the bull semen and absorbable amount of added hyaluronidase preparation by spermatozoa.

For this experiment, 10 ejaculates were obtained by using the artificial vagina from 3 bulls ; one of them was the Japanese Black breed and others were the Holstein breed. Hyaluronidase level was determined by viscosimetry after McClean's technique slightly modified as described in a previous report.

(2) For this purpose, three sorts of determination as described below were performed on the same semen which had been kept at room temperature 5 hours after ejaculation ; semen samples were prepared so as to suitable for the determination as follows :

Determination of semen-hyaluronidase : Hyaluronidase level was determined of the semen which was diluted with distiled warter and did not receive any other treatments such as homogenization. We refer the enzymatic activity of this semen to the semen-hyaluronidase.

Determination of seminal plasma-hyaluronidase : after centrifugation of semen, seminal plasma was obtained and assayed for its enzymatic activity.

Though this enzyme is considered to have diffused into seminal plasma from spermatozoa and we called it the seminal plasma-hyaluronidase.

Determination of sperm-hyaluronidase : The semen was added to distilled warter of 10 cc. and snd shaked, and after centrifugation of it supernatant fluid was decanted. this washing was repeated 4 times. Finally, 10 cc. of an egg yolk emulsion (distilled water 8.5 cc. : fresh egg yolk 1.5 cc.) was added to the sediment (sperm) and it was homogenized in the homogenizer (fig 1) at 18,000 revolutions per minute for ten minutes. The homogenate prepared by the above method was assayed for hyaluronidase. The enzyme remainning in the spermatozoa so treated was determined and named sperm-hyaluronidase.

(3) The data of these determinations were shown in table 1 and the results calculated from them were presented in table 2.

The level of sperm-hyaluronidase per 100 millions of spermatozoa is greater than the differences between semen-hyaluronidase and seminal plasma-hyaluroniase moreover it is generally greater than the level of semen-hyaluronidase itself.

Accordingly, in the determination of semen-hyaluronidase, a part of sperm hyaluronidase may not takes part in enzymatic reaction and this we called tentatively potential (or internal) sperm-hyaluronidase.

The other part of semen-hyaluronidase which takes part in enzymatic reaction in determination of semen-hyaluronidase we called active (or external) sperm-hyaluronidase.

Generally, in the sperm-hyaluronidase at 5 hours after ejaculation, the level of the potential enzyme was about 1.5 times as large as that of the active enzyme.

(4) Hyaluronidase preparation ("Sprase" was used. Sprase is a testicular hyaluronidase preparation of the Mochida Pharmaceutical Mfg. Co., Ltd.,) was added to semen in amount of 60,000 v. r. u. or 120,000 v. r. u. per cc. of semen.

After 5 hours following the addition, sperm-hyaluronidase was assayed for its enzymatic activity.

Comparing with the control, there was little increase of enzymatic activity in the sperm-hyaluronidase by addition of the lower dose, but a little increase was observed by addition of the higher dose.

Speaking of the dose per 100 millions of spermatozoa, the higher the dose the larger absorption of hyaluronidase preparation by spermatozoa result in.

The amount of preparation added which resulted in the absorption of hyaluronidase by spermatozoa seemed to be beyond the harmless level to the motility of bull spermatozoa.

It seems to be difficult to increase the level of sperm-hyaluronidase without decrease in the motility of bull spermatozoa.

牡牛精液に対し均質化などの処理を行わずに，精液の Hyaluronidase〔以下 H-ase とす〕の力価を測定し，之を精液 H-ase（semen－H-ase）と称したことは前報[19]の通りである．此の力価を考慮におき精液に対し各種の量の H-ase 製剤を添加し，その場合に於ける精子の生存率や活力に対する影響を観察した結果についてもすでに報告[18]した．然しながら精液 H-ase と精漿及び精子自体の H-ase の間の量的関係，即ち精液中に於ける H-ase の分布状態については，これまで触れていなかつたので一応これを検討することとした．

また H-ase 製剤の精液への添加，または子宮頸管内への注入により受胎率を増加せしめ得ると云う報告があり，之を肯定するものと否定するものの両論があることは，すでによく知られている．受胎上に於け H-ase 製剤添加の効果を認めるとしても，添加されたる酵素製剤が精子に附着または吸収されて卵子と精子の邂合を助けるものであるか，または牝の生殖器の収縮或いは

吸引運動などにより，精漿と共に邂合場所に到達するものであるかについては明らかにされていない．

もし吸着されないたらば酵素添加の効果は受精前期即ち精子と卵子の邂合までしか期待することが出来ない．H-ase が細胞質の粘度を低減し細胞分裂を促すことを山根[16]は暗示している．従つて，もしまた添加酵素が精子に吸着されるとするならば，その効果は受精後期即ち受精卵の分裂発展の過程に至るまで期待出来るであろう．

以上の様な見地のもとに本実験を行つたのであるが，それらの結果につきここに報告する．

実験材料及び方法

供試精液は岡山県岡山種畜場繋養の健康なホルスタイン種牡牛2頭及び黒毛和種1頭，計3頭の牡牛から擬牝台，人工膣法により得た10例の精液である．

〔I〕精液中に於ける H-ase の分布に対する実験.

此の実験の為に同一の精液試料につき精液 H-ase (semen-hyaluronidase), 精漿 H-ase (seminal plasma-hyaluronidase) 及び精子 H-ase (sperm-hyaluronidase) の測定を行つた.

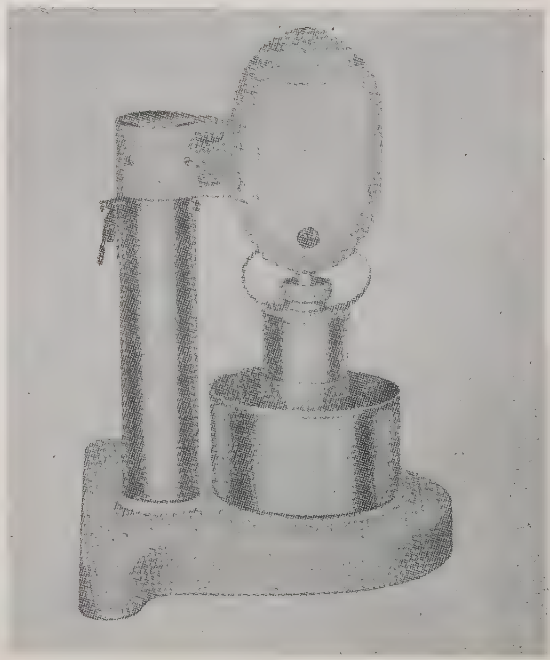
H-ase の測定はすべて第1報に報告した方法,即ち McClean の粘度法を極く僅かに修飾した方法に従つて行つた，そして酵素力価は粘度低減単位 (v. r. u.) で示した．基質である Hyaluronic acid としては人臍帯より抽出した Potassium Hyaluronate を用いた．緩衝液や基質溶液の濃度なども，またこれらと試料の混合割合も前報と同様にした．また，Hyaluronic acid の Factor は持田製薬のそれに一致しており，本実験で得られた粘度低減単位 v. r. u. は持田単位である V. U. M. に一致するものである.

(1). 精液 H-ase の測定：　採取した精液を原液のまま室温に保存し，5時間後に之を蒸溜水で適宜稀釈し，それから30分後に Ostwald の粘度計を用い 34°C. の恒温水槽中で測定した．即ち均質化などの処理を加えない無処理の精液の H-ase 力価を測定した.

(2). 精漿 H-ase の測定：　採取後5時間室温に保存した上述の精液の一部を遠心分離にかけて毎分 6,000 回転で 10 分間分離し精子を完全に沈澱せしめた後．精漿を採り，これを蒸溜水で適宜稀釈してその酵素力価を測定した.

(3). 精子 H-ase の測定：　採取後5時間，室温に保存した精液の一定量 (0.2 cc. または 0.5 cc.) に対し蒸溜水 10 cc. を加え，これを数回振盪した後，毎分 6,000 回転で 10 分間遠心分離してその上清を捨て，残つた少量の上清は細長い濾紙の小片で吸い取つた．此の精子の沈澱塊を白金耳

Fig. 1. Homogenizer used in this experiment.
(made by Nihon Seiki Co., Ltd.)



で予め砕き，これに前と同様10cc. の蒸溜水を加えて再び振盪した後，遠心分離した．此の操作を反復して10cc. 宛の蒸溜水で都合4回，精子を洗滌した．

以上の様にして得られた精子の沈澱塊を 8 cc. の蒸溜水で均質機の容器中に洗い出し，これにさらに 2 cc. の卵黄水（新鮮卵黄1.5cc.：蒸溜水0.5cc.）を加えた．従つて略15%の新鮮卵黄を含む卵黄乳濁液 10cc. に精子塊を入れたことになる．此の混合液を毎分 18,000 廻転で 5 分宛 2 回，都合10分間，均質機（日本精機製，ホモゲナイザーＨＡⅡ型，第1図）にかけた．

また卵黄を添加した理由は筆者の一人，和田[17]が報じた如く蒸溜水稀釈精液を均質機にかけ高速度で均質化するときは H-ase は極く短時間に不活性化して，その力価を失うが，卵黄その他のコロイドを添加しておくと，これが保護膠質となり，その不活性化を阻止し得ることを知つたが爲である．精子の破壊により，その H-ase は此の均質物の中に出て来ているわけであり，之を蒸溜水で適宜稀釈してその酵素力価を測定した．この場合，卵黄の存在の爲に延びる粘度計内に於ける半減時間の延長は僅かに1～2秒であり，測定及び単位計算上大きな困難を来たさない．かくの如く精子に一定量の卵黄乳濁液を加えたものの均質物につき酵素力価を測定して，これを精子 H-ase と称した．

〔Ⅱ〕添加 H-ase 製剤の精子による吸着の実験.

採取後，略1時間に，精液の一定量づつとつて2区に分け一方を対照区，他方を試験区とした．試験区の精液には，その 1 cc. につき 60,000 V. U. M または 120,000 V. U. M を添加して室温に静置した．H-ase 製剤としては持田製薬の寧丸製 H-ase 製剤である Sprase を用いた．添加後5時間経つてから前述の精子 H-ase 測定の方法に従い，これを洗滌し卵黄乳濁液の中で均質化して精子の H-ase 力価を測定した．同じ要領に従つて対照区の精子 H-ase の力価を測定した．試験区と対照区の精子 H-ase 力価を比較し，試験区の酵素の増加量をもつて吸着された H-ase の量とみなした．但し此の場合，一応吸着と云う言葉を用いたが，正しい意味に於ける精子への附着か，または精子による吸收が明らかでない．

実験成績及び考察

〔Ⅰ〕精液中に於ける H-ase の分布.

これに関する実験成績を第1表に示した．また，それから計算せられた結果を示せば第2表の様になつた．

精液 H-ase は，すでに第1報に述べた如く精子1億あたり略10,000 v. r. u. である．本実験に於ては例数も少なかつたのであるが精子1億あたりの精液 H-ase は 8,636 v. r. u. であつた．これに対し精漿H-ase は精子1億あたりにして 3575 v. r. u. であつた．従つてその差は略5,000 v. r. u. でこれは精子自体に帰すべき酵素量である．然し均質化して実際に測定した精子 H-ase の平均値は略 13,500 v. r. u. であつた．

よつて精子 H-ase の中の略8,000 v. r. u. は精液 H-ase の測定に際し粘度計内に於てい酵素力価を発揮しなかつたものである．即ち酵素反応に直接関係しなかつたものである．いま仮りにこれを精子 H-ase の中の潜在性酵素（potential enzym）または内在性酵素（internal enzym）と呼ぶことにするならば前述の精液 H-ase の力価のうち，精子に帰すべき略 5,000 v. r. u. は活性酵素（active enzym）または表在性酵素（external enzym）と称することが出来よう．

以上の諸成績から精子 H-ase は精液 H-ase の略 1.5 倍の酵素力価をもつている．そして精子 H-ase のうち，略20 %乃至 60 %平均 40 %は活性型で存在している．そしてまた略 30%乃至 80

Table 1. Distribution of hyaluronidase in the bull semen.

Semen No.	Name of bull	Date on which semen Collected	Semen: No. of sperms 100 millions per cc.	Semen: pH	Semen: percentage of motile sperm (卌)	Semen: percentage of live sperm	Semen-hyaluronidase per cc. of semen v. r. u.	plasma-hyaluronidase per cc. of semen v. r. u.	Sperm-hyaluronidase per cc. of semen v. r. u.
1	K. Don	4 Nov. 53	13.7	6.0	92	98	111,470	40,661	200,607
2	K. Gemima	6 Nov. 53	9.7	6.2	63	88	87,209	56,872	169,435
3	K. Don	10 Nov. 53	12.3	5.6	90	94	87,082	44,054	196,261
4	K. Don	16 Nov. 53	11.1	5.8	74	88	102,517	36,296	255,566
5	K. Gemima	18 Nov. 53	11.0	5.6	—	—	115,718	38,913	188,556
6	K. Gemima	9 Nov. 54	9.1	—	46	75	103,015	47,043	117,894
7	Chine	12 Nov. 54	20.2	—	84	94	133,918	43,244	136,363
8	K. Don	16 Nov. 54	12.7	—	78	88	160,413	62,707	132,110
9	Chine	19 Nov. 54	13.7	—	65	80	67,593	32,606	92,836
10	Chine	26 Nov. 53	15.2	—	98	99	105,298	29,084	145,974

Table 2. Sperm-hyaluronidase in the bull semen calculated from the data in table 1.

Semen No.	Semen-hyaluronidase per 100-millions of spermatozoa (A)	Plasma-hyaluronidase per 100-millions of spermatozoa (B)	Sperm-hyaluronidase per 100-millions of spermatozoa (C)	Active sperm-hyaluronidase (A)—(B) (D)	Potential sperm-hyaluronidase (C)—(D) (E)	$\frac{(E)}{(D)}$	$\frac{(D)}{(C)}$
1	8,136	2,967	14,642	5,169	9,473	1.83	0.35
2	8,990	5,863	17,467	3,127	14,340	4.58	0.18
3	7,079	3,581	15,956	3,498	12,458	3.56	0.22
4	9,235	3,269	23,023	5,966	17,057	2.85	0.26
5	10,519	3,537	17,141	6,982	10,159	1.45	0.41
6	11,320	5,169	12,955	6,151	6,804	1.10	0.47
7	6,593	2,140	6,750	4,453	2,297	0.51	0.66
8	12,630	4,937	10,402	7,693	2,709	0.35	0.74
9	4,933	2,380	6,776	2,553	4,223	1.65	0.38
10	6,927	1,913	9,603	5,014	4,589	0.91	0.52
Average	8,636	3,575	13,471	5,061	8,428	1.88	0.42

%平均60%は潜在酵素として存在している．また活性酵素に対する潜在酵素の比率は0.4倍乃至4.5倍である．要するに精液H-aseの測定に於いて酵素反応にあづかるのは精子H-aseのうちの略4割で残余は潜在的に存在していることになる．潜在H-aseは位置的に精子の内部にあるものか，或いは位置的には精子の外表近くに存在していながらも酵素的に不活性状態にあるものか明らかでない．精子の中節部にはミトコンドリヤに相当する部が存在していると云われているが，H-aseの一部が精子の内部にあるとすれば，おそらく此の様な部にしかも前駆物質の型で存在し

ており，これが均質化などにより破壊露出せられ酵素作用を呈するすのではないかと思われる.

Bergenstal and Scott[(2)] や高嶺[(13)]その他の報告により採取後の時間の経過や，精子の活力の低下に伴い精漿中に於ける H-ase の増量を来たすことが知られている．従つて此の潜在 H-ase が時間の経過やまたは精子の活力の低下と共に精漿中に遊離して来るものと思われる.

いま精液中に於ける全酵素量を H.total として精子1億あたりにつき推算すると次の様になる.

H. total＝H. semen＋H. sp. pot.　　但し H. semen は精液 H-ase

H. sp. pot. は精子の潜在 H-ase

実験例数が少くて不確実であり且つ夫々の精液で異つてはいるが精液 H-ase と精子の潜在 H-ase の比は略0.9と云う平均値を得た．この数値は実験例の増加により訂正すべきものと思われるが一応此の数値でもつて計算すると

$$\text{H. sp. pot.} \fallingdotseq \text{H. semen} \times 0.9$$

$$\therefore \ \text{H. total} \fallingdotseq \text{H. semen} \times 1.9$$

従つて精子1億あたりの精液 H-ase を 10,000 v. r. u. とすると精液中の全酵素量は略 19,000 v. r. u. と云うことになる.

〔Ⅱ〕精子による添加 H-ase 製剤の吸收．これに関する実験成績は第3表に示した.

Table 3. Absorption of added hyaluronidase preparation by spermatozoa.

Semen No.	No. of sperms 100millions per cc.	Dose of hyaluronidase added per cc. of semen v.r.u/cc.	Dose of hyaluronidase added per 100 millions of sperm. v.r.u./cc.	Semen hyaluronidase, v. r. u. original (control) per cc. of semen	Semen hyaluronidase, v. r. u. original (control) per 100 millions of sperm.	Semen hyaluronidase, v. r. u. after addition of hyaluronidase preparation (test) per cc. of semen	Semen hyaluronidase, v. r. u. after addition of hyaluronidase preparation (test) per 100 millions of sperm.	Increased activity of hyaluronidase per 100 millions of spermatozoa
1	13.7	60,000	4,370	200,607	14,642	207,221	15,125	483
2	9.7	120,000	12,370	169,435	17,467	207,253	21,366	3,899
3	12.3	60,000	4,870	196,261	15,956	183,767	14,940	-1,016
4	11.1	60,000	5,400	255,566	23,023	255,566	23,023	0
5	11.0	60,000	5,450	183,123	16,647	173,438	15,767	-880
6	9.1	120,000	13,180	117,894	12,955	127,659	14,028	1,073
7	20.2	120,000	5,940	136,363	6,750	150,993	7,474	724
8	12.7	120,000	9,440	132,110	10,402	168,865	13,296	2894
9	13.7	60,000	4,370	92,836	6,776	110,939	8,097	1,321
10	15.2	60,000	3,940	145,974	9,603	143,467	9,438	-165

4例の精液を用い，夫々その1cc. に対し Sprase を 120,000 v. r. u. 添加したが，この場合精子1億あたりの添加量は 5,940 v. r. u. 乃至 13,186 v. r. u. であつた.

また他の6例の精液に対しては夫々その 1cc. につき 60,000 v. r. u. を添加した．この場合添加量は精子1億あたり 3,947 v. r. u. 乃至 5,454 v. r. u. であつた．精子体内に拡散吸收せられたものか，または単なる附着か明らかでないことは前述の通りであるが H-ase 製剤の添加により増加した精子 H-ase をもつて一応精子に吸着されたものとしたが 60,000 v. r. u. の添加では精子 H-ase は殆んど増加しない．120,000 v. r. u. 添加では精子1億あたり平均，略 2,000

v. r. u. ほど酵素力価が増加している．従つて極く多量の製剤は添加した場合，少量ではあるが，その一部は精子に吸着されたものと思われる．

然しながら第2報[18]に報告した如く数万単位以上の Sprase の添加は精子の活力の低下を来たす傾向があつた．

また別の観点から受精現象に H-ase が関与するとしても，受精前期，即ち精子が卵子に進入する過程と，受精後期即ち卵核と精核が合一して分裂発生の準備を整える過程に分けて考えるべきであろうと思われる．受精前期に濾胞細胞や放線冠細胞を分散離開させるのみならば精液 H-ase が重要な役割を演んずるであろうが受精後期には精子 H-ase が重要な役割を演んずるものではあるまいか．

精子の活力を減んずることなしに精子 H-ase を増加することが無理なことが判つたのであるから受精後期に関する限り精液に対する H-ase の添加は無意味な様に思われる．

牛の卵管卵子が放線冠細胞で囲まれ精液中の H-ase によつて此の放線冠が離開分散することが事実であると思われる．此の際，精漿 H-ase も之に関与するかも知れないが，精子の活性 H-ase は少くともこれに関与するものと思われる．

併し乍ら H-ase 製剤の添加により活力を正常に保ち且つ精子 H-ase の増加を期待することが出来ないとするならば，精液に対する H-ase 添加の効果は結局，精漿中の H-ase の増加に基づく効果にまつよりほかはないものと思われる．この点については今後さらに検討を進める積りである．

摘 要

(1)．精液中に於ける H-ase の分布及び添加 H-ase 製剤の精子により吸着される量を検討する為に此の研究を行つた．此の実験の為に3頭の牡牛（その中1頭は黒毛和種，他の2頭はホルスタイン種）から人工膣法により10例の精液を得た．H-ase の測定は前報に述べたと同様に Mc Clean の方法を僅かに修飾した粘度法によつた．

(2)．この目的の為に採取後5時間，室温に保つた同じ精液試料につき次の様な3種の測定を行つた，そしてそれに適する様に精液を調整した．

精液 H-ase の測定： 均質化や，その他の処理を加えない精液を蒸溜水で稀釈して H-ase 量を測定した．此の酵素力価を精液H-ase によるものとした．

精漿 H-ase の測定： 精液の完全な遠心分離後，精漿を得て，その酵素力価を測定した．此の酵素は精子から精漿中に遊離したものと考えられるが，吾々は之を精漿 H-ase と称した．

精子 H-ase の測定： 精液 0.2cc. または 0.5cc. に蒸溜水 10cc. を加え遠心分離後上清を傾斜した．此の洗滌を4回反復した．最後に沈澱（精子塊）に 10cc. の卵黄乳濁液（蒸溜水 8.5cc. ：新鮮卵黄 1.5cc.）を加え，それを1分間 18,000 回転のホモゲナイザーで均質化した．上記の如くしてつくられた均質物の H-ase を測定した．精子中に残つている H-ase が測定されたものでこれを精子 H-ase と称した．

(3)．これらの測定成績を第1表に示し，それから計算された結果を第2表に示した．

精子一億あたりの精子 H-ase の量は精液 H-ase と精漿 H-ase の差よりも大きく，概して精液 H-ase そのものよりも大きい．

従つて精子 H-ase の一部は精液 H-ase の測定に於いてその酵素反応にあづかつていないことになる．吾々はこれを潜在的（または内在的）精子 H-ase と称した．そして精子 H-ase の中で酵素反応に参加する他の部分を活性（または表在性）精子 H-ase と称した．

一般的に射精後5時間の精液に於いて潜在的酵素の量は活性酵素の量の略1.5倍であつた．

（4）．H-ase 製剤（持田製薬の睾丸性 H-ase 製剤である Sprase を使用した）を精液1cc に対し60,000 v. r. u. または120,000 v. r. u. 添加した．添加後5時間以後に於いて精子 H-ase の酵素力価を測定した．対照区と比較するとき前者の量の添加では精子 H-ase の力価は殆んど増加しないが，後者の量では僅かに増加する．

精子1億に対する用量の点からするならば高い用量では大きな吸收を結果する．

精子による吸收がみられる H-ase 製剤の用量は精子の運動性に対し無害の範囲を超えている様に思われる．精子の運動性を減んずることなしに精子 H-ase の量を増すことは困難と思われる．

本実験を行うにあたり精液の供与その他の御援助を戴いた岡山県岡山種畜場場長辛島忠氏，技官渡辺滋樹氏に深謝の意を表する．

文　　献

1) 秋谷七郎，相沢登（1952）；Hyaluronidase に就いて．スプラーゼ文献集，第一輯，PP. 1～9.

2) Bergenstal, D. M. and Scott, W. W. (1948) ; Studies on hyaluronidase. J. Amer. Med. A., 137 (17), PP. 1507～1511.

3) Johnstone, J. E., Ston E. J., and Mixner, J. P. (1949) ; Hyaluronidase relationships in dairy bull semen. J. Dairy Sci., 32—6, PP. 574～579.

4) Johnston, J. E. and Mixner. J. P. (1948) ; Development of hyaluronidase in bull semen. J. Animal Sci, 7～4, PP, 440～446.

5) Johnston, J. E. and Mixner, J. P. (1950) ; Relationship of hyaluronidase concentration to fertility of dairy bull semen. J. Dairy Sci., 33～11, PP. 847～850.

6) Johnston, J. E. and Mixner, J. P. (1951) ; Effects of added hyaluronidase and hyaluronic acid on the motility of bull spermatozoa. J. Dairy Sci., 34～2, PP. 116～118.

7) 加藤浩（1952）；卵子と精子の特殊物質（2）．畜産の研究，6—5，PP. 294～298.

8) McClean, D., Hale, C. W. (1941) ; Studies on diffusing factors the hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrats and other agents that increase tissue permiability. Bichem. J. (1, 2), PP. 159～183.

9) Pommerenke, W. T. and Ellenmae Virgiver (1947) ; Comparison of rates of penetration of unwashed and washed spermatozoa in cervical mucus. Proc. Soc. Fxper. Biol. and Med., Vol. 66, 161～163.

10) 相山正雄（1940）；受精生理学．P. 18養賢堂.

11) Sallman, B. and Birkeland, J. M. (1950) ; Interrelationships of spermatozoa count, hyaluronidase titer, and fertilization. Ann. N. Y. Acad. Sci., 52, PP. 118～1191. (Animal breeding abstracts, 19—4, PP, 468～469, 1951)

12) 高島達夫（1951）；精液中の Hyaluronidase に関する研究．日本産科婦人科学会雑誌，3—2，P. 69.

13) 高嶺浩（1952）；受精と Hyaluronidase 及びその inhibitor について．スプラーゼ文献集，第二輯，PP, 69～75.

14) 高嶺浩（1953）；受精に於ける子宮頸管粘液の意義．畜産の研究，7—1，PP. 9～12.

15) 和田宏（1954）；牡牛精液ヒヤルロニダーゼの実験的不活性化及びその阻止．岡山大学農学部学術報告，第4号，PP. 32～42.

16) 和田宏，竹原宏（1954）；人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究（2）添加 Hyaruronidase が牡牛精子の活力に及ぼす効果．岡山大学農学部学術報告，第5号，PP. 40～47.

17) 和田宏，竹原宏（1954）；人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究（1）牡牛精液の Hyaluronidase 力価について．日本畜産学会報，25巻，2－4号，PP. 111～117.

18) 山根甚信（1952）；繁殖生理学領域に於ける Hyaluronidase の意義．スプラーゼ文献集，第二輯，PP. 60～69.

19) 安田徳治，高橋茂孝（1952）；家畜精液中の全 Hyaluronidase 含有量について．日本畜産学会報，23巻，3号，PP. 99～101.

人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究

(4). 牡牛精液の受精力に対する Hyaluronidase 製剤の効果

和田　宏・竹原　宏*・湯原正高

Studies on Hyaluronidase in the Artificial Insemination

(4) Effect of Hyaluronidase Prepalation on the Fertility of Bull Semen.

Hiroshi WADA, Hiroshi TAKEHARA* and Masataka YUHARA

To study the practical value of hyaluronidase preparation in the artificial insemination of the cattle, the following four experiments were carried out, and according to the results of these and those reported in the previous reports, discussion was made on the effect of hyaluronidase preparation in the artificial insemination.

For the hyaluronidase preparation "Sprase" was used.

(1) Experiments are summarized as follows.

Experiment I ;

Fourty-seven services were made to 35 Holstein cows. In 34 services of them, Sprase of 2,000 v. r. u. or 5,000 v. r. u. dissolved in 1 cc. of normal saline was put into the cervix about 20 to 30 minutes before insemination. The rest 13 services were the control and in which Sprase was not injected. No appreciable effect of the preparation on the fertility was not obtained (table 1).

Experiment II ;

Sixty-one of Holstein cows that had the first calving were inseminated by the semen diluted 1 : 3 with fresh egg yolk. Of 39 cows which did not conceived from the first service though they had normal reproductive organs and were free from any disturbances in their genital tracts, 26 cows were inseminated by the semen diluted as above mentioned with Sprase of 5,000 v. r. u. per one cc. added. The number of services that they received were 45. The rest 13 normal cows were the control, and received 22 services (table 2). Conception was determined by rectal palpation. Fertility was about 58% in both groups respectively. These insemination records were shown in table 3. Consequently, effect of adding hyaluronidase on the fertility of bull semen was not recognized.

Naturally, there was no effect on the sex of the young.

Experiment III ;

* 岡山県立中国酪農講習所　技師

The semen from 3 Holstein bulls was diluted with egg yolk-glucose-citrate diluter and 5,000 v. r. u. of Sprase was added to the semen diluted seven times, 10,000 v. r. u. of Sprase to the semen diluted fifty times, and 40,000 v. r. u. of Sprase to the semen diluted seventy times respectively. In the test, the cows were inseminated by the semen treated and the total number of services was 71. In the control, cows were inseminated by semen without Sprase and the total numder of services was 123. There was no effect of hyaluronidase preparation on the fertility in this experiment either (table 4).

Experiment IV ;

Thirty-two semen samples were obtained from 4 bulls (3 Holsteins and one of the Japanese Black breed). No correlation between the semen-hyaluronidase and fertility could be found, and this is to be expected from the results in above experiment (table 5).

(2) Sprase of 40,000 v. r. u. was put into the cervix of a cow about 5 minutes before insemination. In spite of ovulation having occurred as judged by the rectal palpation and in spite of insemination having been tried in 3 estrus periods with such a dosage as 40,000 v. r. u., she failed to conceive.

(3) From the results obtained in this stndy, effect of hyaluronidase preparation in the artificial insemination of cattle cannot be recognized. The evidences, reported by other investigators, supporting the conclusion are given below and discussion has been made as follows.

a). Hyaluronidase preparation added to semen in amount which results in no decrease of viability and motility of spermatozoa is not absorbed by the spermatozoa.

b). In the normal semen, spermatozoa seemed to posses the enzyme in an amount sufficient to play its role and it seems not nessesary to add the preparation.

c). It has been reported that amongst the ungulates the corona radiata cells disappear soon after ovulation. The absence of these cells has been recorded for the cow (Hartman et al., 1931; Evans and Miller, 1935, and Hamilton and Laing, 1946). There have been similar records for the sheep, the pig and the horse. Therefore the dissolution of the corona radiata cells may be not an essential premise for fertilization in these animals.

d). It has been observed in the mouse and in the rat that spermatozoa penetrate into the ovum with the follicie cells attached to it.

(4) But the present writers do not completely deny roles of hyaluronidase in fertilization. According to the suggestion giyen by Yamane (1952), we should have to see much of meaning in hyaluronidase after penetration into the ovum by spermatozoa as well as before the penetration.

哺乳類の卵管卵子を囲繞する Corona radiata や Follicle cell は hyaluronic acid を含む粘稠物質で纒結されており，hyaluronidase〔以下 H-ase とす〕はこの hyaluronic acid を depolimelize してその粘度を減んじ，周囲の細胞を分散させて卵子を裸出せしめて精子との邂合を可能ならしめるものと解釈されている．この様な見解に基づきヒトまたは家畜に於いて H-ase の応用による受胎率の増進，または一部，不妊症の対策として多くの実験が行われている．今までに報告せられた H-ase を用いての授精試験は，此の酵素を精液に対し直接添加するものと授精または性交前に子宮頸管内に注入するものとの二つに分けられる．

ヒトに就ては Morieard (1946) は前者の方法で Kurzrok (1946) は後者の方法で，かなり良い成績を得ている．極く少数例ではあるが本邦では高島 (1951) や渡辺 (1952) の肯定的報告がある．Rowland (1944) はそのままでは受精させ得ない様な稀釈精液でも H-ase の添加により受精させ得ることを家兎で実証し，此の酵素添加により精子濃度は普通の場合の稀釈度の 1/6 で足りると云つている．

これに反し Seigler (1947) はヒトにつき受精上に於ける H-ase の効果を否定しており，また Change (1947) は家兎で此の酵素は受精と無関係であり，家兎精液中の受精有効成分は，その上清にあると云つている．

Sallman and Birkeland (1947) は H-ase の濃度に有効な閾値があり，閾値以上は却つて有害であると報じ Johnston and Mixner (1950) は牛に於いて酵素濃度と受胎率は全く無関係であると云つている．最近，高嶺等 (1954) は不妊牛に於ける受胎増進に対する H-ase の効果の肯定的報告をしている．その他，子宮又は頸管粘液中での H-ase の意義に関しても種々の報告がある．斯くの如く H-ase の受精に於ける意義，効果に関しては必ずしも見解が一致していない．

筆者等も昭和27年以来，牛の人工授精に於ける H-ase の応用効果に関する二，三の実験を行つたので，その成績を報告し，且つその応用価値に対する検討を加え度い．

実　験　方　法

H-ase 製剤を用いて三種類の授精試験を行い，また別に測定した精液につき，その精液 H-ase と受胎率の間の相関係数を求めてみた．本研究に於いて用いた H-ase 製剤は持田製薬の睾丸性 H-ase 製剤である Sprase であつた．而してその酵素単位 V. U. M. は筆者等が精液 H-ase などの測定にあたり用いた粘度低減単位 v. r. u. と一致するものである．

〔Ⅰ〕第1試験，子宮頸管内注入 H-ase の受胎上の効果に関する試験

これは岡山市内に多数のホルスタイン種乳牛を繋養するK牧場の協力を得て昭和27年8月2日より同年9月24日までの間に行つたものである．

供試精液はK牧場繋養の牡牛1頭から膣内採取法によつて採り，それを新鮮卵黄で2倍に稀釈し，さらに注入前にリンゲル氏液で2倍，都合4倍に稀釈した．此の稀釈精液を発情末期の最適期と思われる時期に子宮頸管内に注入した．Sprase は1回に 2,000 V. U. M. または 5,000 V. U. M. を使用し，これを 1 cc. の生理的食塩水に溶かして精液注入前 20～30 分に頸管内に注入した．41頭のホルスタインまたはホ種系牝牛に延56回の授精を行つたが後日検査により卵巣嚢腫その他の蕃殖障害及び異常発情であつたものを除外して，結局35頭の正常牛について行つた延47回の授精について成績を求めた．

これらのうち，同一日に発情した牛の一部から公平に1～2頭を選んで対照とし，これには

Sprase を注入しなかつた，而してその回数は13回であつた．従つて Sprase を注入したのは34回で，そのうち14回は，2,000 V. U. M. の酵素を，残りの20回は 5,000 V. U. M. の酵素を夫々1回に使用した．

授精後2～3カ月のうちに発情の到来しないものをもつて受胎とみなして受胎成績を求めた．

〔Ⅱ〕第2試験，低倍率稀釋精液に添加せる H-ase の受胎上の効果に關する試験

これは岡山県邑久郡畜産農業協同組合の協力のもとに昭和27年11月27日から同28年2月11日までの間に行つたものである．

供試精液は同協同組合繋養のホルスタイン種牡牛から横取式人工膣法で採取したもので精子活力は何れも卅80%以上のもののみであつた．採取精液は新鮮卵黄2：精液1の割合，即ち3倍に稀釈して保存した．授精直前に上記稀釈精液1 cc. に対し Sprase を 5,000 V. U. M. 添加して子宮頸管内に注入した．授精後2カ月目に直腸検査により妊否を判定し，また分娩後は一応参考の爲に産犢の性別も調査した．

供試牝牛として先づ61頭の初産のホルスタイン牝牛を選び Sprase を用いないで普通の人工授精を行つた．そのうち1回の人工授精で受胎した16頭及び後日検査の結果，異常発情その他卵巣，生殖器疾患のあるもの6頭を除外し，結局第1回の授精で受胎しなかつた39頭の牝牛を実験に供した．このうち13頭は対照として普通の人工授精を実施し，他の26頭は試験区として Sprase を添加した精液で人工授精を行つた．対照区，及び試験区の授精回数は夫々22回及び45回であつた．

〔Ⅲ〕第3試験，高倍率稀釋精液に添加せる H-ase の受胎上の効果に關する試験

この試験は岡山県岡山種畜場の協力のもとに昭和27年8月1日から翌年1月18日までにホルスタイン種牝牛に対し行つたものである．

供試精液は同種畜場繋養のホルスタイン種牡牛3頭から擬牝台，人工膣法により採取し，採取後，常法に従つて卵黄グルコチトラートで稀釈し，5～6°C. に冷藏し．用に臨んでその1 cc. 宛を子宮頸管内に注入した，同一の精液を試験用と対照用に区分し，試験用のものは稀釈時に Spraseを添加した．添加酵素量は稀釈精液1 cc. に対し5,000 V. U. M. 10,000 V. U. M. または40,000 V. U. M. とした．

5,000 V. U. M. 添加の場合の供試精液は12例で，授精回数は試験区26回対照区37回であつた．これら精液の稀釈度は試験区及び対照区とも同一にし精液原液を平均略7倍稀釈にした．10,000 V. U. M. 添加の場合の供試精液は14例でその授精回数は試験区24回，対照区，54回であつた．供試精液のうち対照区用のものは精液原液を平均略7倍に稀釈し，試験区用のものに限り精子濃度をさらに略1/7にした．

即ち試験区用の精液の精子濃度は原精液のそれからみると略1/50になり，対照区用の精液のそれからみると略1/7になつているわけである．

40,000 V. U. M. 添加の場合の供試精液は6例であり，その授精回数は試験区21回，対照区32回であつた．これらの精子濃度は，対照区用のものは原精液のそれの平均，略1/7であり，試験区用のそれは原精液のそれの略1/70であつた即ち試験区の精子濃度は対照区のそれの1/10にしたわけである．

此の試験に於いて試験区合計71回，対照区合計123回の授精が実施されたが，その後，2，3カ月の中に発情の徴候のないものをもつて受胎とみなした．

〔Ⅳ〕精液の H-ase とその受精率の相關

筆者等は蒸溜水で稀釈した無処理精液の H-ase を McClean の方法を僅かに変更した粘度法

で測定し，之を精液 H-ase (semen-hyaluroindase) と称したことは，既に報告[2)]した通りである.

此の研究の目的のために用いた精液は岡山県岡山種畜場繋養のホルスタイン種3頭，黒毛和種1頭，計4頭の種牡牛から採取したものである．昭和28年4月16日から翌年3月9日までの間に H-ase を測定した精液のうちの32例につき各精液の採取後5時間に於ける精液 H-ase 力価と受胎率の間の相関係数を求めた．これらの精液は卵黄－葡萄糖－枸櫞酸緩衝液で略10倍に稀釈して用いられたがその総授精回数は167回であつた．その受胎率は授精後60乃至90日に於ける発情の再来しないことをもつて判定した.

なほ精液のうち5例，授精回数にして17回は黒毛和種のものであり，他は全部ホルスタイン種のものであつた.

試験成績及び考察

授精に先だつて子宮頸管内に H-ase を注入した場合の第1試験の結果は第1表に示した．この第1試験の受胎成績は全般的に悪いが，これはK牧場は搾乳専業の牧場で平素よりあまり受胎率が良くなかつた上に，夏季の受胎率の最も悪い時期に試験が実施された為である.

少数例で決定的なことは云えないが試験区の 2,000 V. U. M. 注入区と 5,000 V. U. M. 注入区の受胎率の間に差はみられない．これだけの結果からみると対照区よりも試験区の方が受胎率が良くなつている．併しながら H-ase を注入した試験区の受胎率も一般の人工授精の受胎率に比べて決して良好とは云えない．頸管内への H-ase の応用により Kurzrock や高嶺はそれぞれヒト及び不妊牛で，ある程度の効果の肯定的報告をしている．筆者等の行つた第1試験の結果からは H-ase の効果を肯定することは出来ない.

Table 1. Effect on fertilization of hyaluronidase preparation put into the cervix of cow about 20 to 30 minutes before insemination.

Group	Amount of hyaluronidase preparation, injected	Services	Nonreturns	Fertility(%)
Treatment	2,000 v. r. u.	14	6	43
	5,000 v. r. u.	20	9	45
	Total	34	15	44
Control		13	4	30

(1) For the hyaluronidase preparation, "Sprase" was used in this study. It is a testicle hyaluronidase preparation of the Mochida Pharmaceutical Mfg. Co., Ltd. and furnished sufficiently by the same company.

(2) One cc. of the semen diluted 1 : 4 was inseminated into the cervix in each service in above experiment.

(3) Fertility estimates were based on the percentage of nonreturns to services, after a 60- to 90-day period following service.
This is common to table 4 and table 5.

稀釈度の比較的低い精液に H-ase を添加した第2試験の結果は第2表に示した．これに於ては対照区，試験区ともに受胎率は殆んど同様に58%前後であり，その間に差異はない．各牝牛に対する授精回数と受胎の関係及び補足的に調査した産犢の性別等は第3表に示した．もとより例

数が少ないので得られた結果から H-ase の効果に関して即断することは許されないが，少くともこれだけの結果からすると精液に添加した此の程度の H-ase により受胎率の増加を期待する

Table 2. Effect on fertilization of hyaluronidase preparation added to the semen of lower dilution.

Group	Cows	Services	Nonreturns	Fertility(%)	Sex of the young ♀ : ♂ : (?)
Treatment	26	45	26	59	10 : 13 : (3)
Control	13	22	13	58	9 : 3 : (1)

(1) One cc. of the semen diluted 1 : 3 was used in each service.

(2) Conception was determined by rectal palpation.

Table 3. The insemination records of cows mentioned in table 2.

Group	Cow no.	Service					Sex of the young
		1st	2nd	3rd	4th	5th	
Treatment	1	×	○				♂
	2	×	○				♀
	3	×	×	○			♂
	4	×	○				♀
	5	×	×	○			♂
	6	×	×	○			♂
	7	×	○				♂
	8	×	○				?
	9	×	○				♀
	10	×	×	×	○		♂
	11	×	×	○			♂
	12	×	×	○			♂
	13	×	×	○			♀
	14	×	×	○			♂
	15	×	×	×	×	○	?
	16	×	×	×	○		♀
	17	×	○				♂
	18	×	○				♀
	19	×	×	×	○		♂
	20	×	○				♀
	21	×	○				♀
	22	×	×	○			♀
	23	×	×	○			♂
	24	×	○				♀
	25	×	○				♂
	26	×	×	○			?

Group	Cow no.	Service					Sex of the young
		1st	2nd	3rd	4th	5th	
Control	27	×	×	○			♀
	28	×	○				♀
	29	×	×	○			♀
	30	×	×	○			♀
	31	×	×	×	○		♂
	32	×	×	○			♂
	33	×	○				?
	34	×	○				♀
	35	×	×	×	○		♀
	36	×	○				♀
	37	×	×	○			♂
	38	×	○				♀
	39	×	○				♀

○ Conceived　　× Not conceived

At the first service, hyaluronidase preparation was not added to the semen in the treatment

ことは出来ない様に思われる．従つて勿論，産仔の性別等に対しても何等影響のないことは調査結果によつても明らかである．

また，異状牛即ち授精後，検査の結果，明らかになつた卵巣嚢腫牛5頭，永久黄体残存牛1頭は受胎率の計算から除外したことは前述した通りであるがこのうち，卵巣嚢腫牛3頭，永久黄体残存牛1頭，計4頭に対し1 cc 当り 5,000 V. U. M. の H-ase を添加した精液で延10回の授精を行つたことになつたがこれらは当然無効であつた．

H-ase を添加した比較的高倍率稀釈精液をもつて行つた第3試験の結果は第4表に示した．此の実験は盛夏の候のものも含まれており受胎率は望はましいものではなかつた．

第3試験Aに於ては略7倍稀釈精液に対し，種々の精子濃度の精液 1 cc. に対し Sprase 5,000 V. U. M. を添加したのであるが，試験区，対照区夫々 26 回及び 37 回の授精に於いて両者とも受胎率は夫々，略43%で両区の間に差はみられなかつた．

第3試験Bに於ては試験区の精子濃度は対照区の精子濃度（原精液の平均略1/7）の略1/7であつた．精子濃度の点では不利であつたにもかかわらず試験区の方が却つて受胎率が良かつた．

第3試験Cに於ては精子濃度が対照区の1/10の精液に 1 cc. 当り 40,000 V. U. M. の H-ase を添加したのであるが，試験区及び対照区の受胎率は夫々38%及び56%で対照区の方が多少優れている様に思われた．

併し乍ら各精液につき，夫々，試験区及び対照区の受胎率を角変換して統計処理を行つたところ第3試験A，B及びCの各区に於いて各々の精液の受胎率の平均値に於ける試験区と対照区の間の差を検定した処，Pの値は次の様になり夫々の区に於いて対照区と試験区の間に有意差はな

Table 4. Effect on the fertilization of hyaluronidase preparation added to the semen of higher dilutions.

Expt.	Hyaluronidase dosage per cc.	ejaculates	Group	Rate of dilution	services	nonreturns	Fertility (%)
A	5,000 v. r. u.	12	Treatment	1 : 7	26	11	42
			Control	1 : 7	37	16	43
B	10,000 v. r. u.	14	Treatment	1 : 50	24	14	58
			Control	1 : 7	54	22	42
C	40,000 v. r. u.	6	Treatment	1 : 70	21	8	38
			Control	1 : 7	32	18	56
Total		32	Treatment		71	33	45
			Control		123	56	46

One cc. of the diluted semen was used in each service.

かつた.

Expt. A　　P : 0.4～0.3

Expt. B　　P : 0.6～0.5

Expt. C　　P : 0.4～0.3

授精試験では牝牛の状態を完全に一様にすることは困難であり少数例の統計処理を，そのまま信用することは危険であると思われるが，これらの実験の結果，50乃至70倍くらいに稀釈した精液に精子の活力を減退させない程度に H-aseを添加した場合，7倍くらいに稀釈した対照区との間に於いて受胎率に有意差のないことが示された.

稀釈液の種類によつて異ることではあるが，T. P. Verevkina & P. N. Statkin や A. N. Volkov または E. P. Karassev が GPC～3 または GPC～4 を用いて稀釈と牛の精液の受精力の関係を試験した成績によれば精液の原液または16倍以下の稀釈に比し，32倍または64倍稀釈の場合の受精率の方が前者よりも若干優れているか，または少くとも前者に劣らないことを示している(6). 従つて筆者等の実験の受精率に於いて7倍稀釈の対照区と 50 乃至 70 倍に稀釈し H-ase を添加した試験区の間に差がないが，之を直ちに H-ase の効果に帰し，それにより受精率の低下が防止せられたと断定することは出来ない. 筆者等が得た受胎率は牛の一般の人工授精に於けるそれに比して決して優れたものではなく，むしろ低い位いである. 以上の様なことから第3試験に於ても添加 H-ase の効果を肯定することは出来ない.

第4試験の結果は一括して第5表に示した.

32例の精液で行つた167回の授精に於いて71頭が受胎し平均受胎率は42%であつた.

精液 H-ase と受胎率の関の相関係数（γ）は次の様になつた.

$$\gamma = 0.114 \qquad P : 0.6 \sim 0.5$$

従つて精液 H-ase と受胎率の間には何の関係もないことが明らかになつた. これは Johnston and Mixner の成績と一致し，上述の第1乃至第3試験の成績を裏付ける様に思われる.

Table 5. The relation of fertility of bull semen to the level of semen-hyaluronidase.

Name of bull.	Date on which semen was obtained.	5-hr. semen-hyaluronidase level, v. r. u./cc.	services.	nonreturns.	Fertility. (%)
King Done	4/16/53	192,088	4	3	75.0
	4/20/53	66,607	5	3	60.0
	6/ 5/53	110,569	4	2	50.0
	6/17/53	76,408	9	6	66.6
	6/23/53	93,610	6	1	17.8
	8/ 4/53	94,047	3	1	33.3
	8/10/53	82,117	7	1	14.2
	9/ 5/53	130,000	5	2	40.0
	9/ 1/53	101,250	6	2	33.3
	10/19/53	92,250	4	2	50.0
	12/10/53	80,750	6	3	50.0
	12/18/53	107,000	10	5	50.0
	11/10/53	87,082	3	2	66.6
	9/ 9/53	120,000	4	2	50.0
	2/20/54	125,229	8	5	62.5
	3/ 8/54	103,840	2	1	50.0
King Gemima	6/19/53	101,034	6	1	17.8
	6/25/53	100,668	4	2	50.0
	8/ 6/53	113,395	5	2	40.0
	9/ 3/53	155,000	7	3	42.8
	9/11/53	114,250	4	3	75.0
	9/15/53	94,750	7	2	28.5
	1/21/54	116,850	9	3	33.3
Carnation Imperial	5/28/53	91,032	6	1	17.8
	6/21/53	111,758	8	2	25.0
	8/ 2/53	107,864	5	2	40.0
	2/28/54	127,771	3	2	66.6
Chine*	6/22/53	87,737	2	2	100.0
	7/ 3/53	78,951	2	1	50.0
	8/ 4/53	96,457	6	2	33.3
	8/18/53	103,242	5	1	20.0
	3/ 9/54	78,823	2	1	50.0
Total			167	71	42.0

* An asterisk represents the bull of Japanese Black breed.

The correlation coefficient of 0.150 (P : 0.6 − 0.5) was obtained between the semen-hyaluronidase level and the fertility.

筆者等は前報[2]に於いて精液中の H-ase を精漿 H-ase と精子 H-ase に分け，精子 H-ase をさらに分けて活性又は表在性 H-ase と内在性又は潜在性 H-ase とし，筆者等の云う精液 H-ase は精漿 H-ase と活性精子 H-ase の合計であることを示した．さらに活性精子 H-ase と潜在性精子 H-ase の比は略 4：6 であり，精子 H-ase は精液 H-ase の略1.5倍の酵素力価をもつており，潜在性精子 H-ase 自体が精液 H-ase と略，同量であり，精漿 H-ase は採取後5時間に於いて精液 H-ase の1/2乃至1/3であることを明らかにした．

また同じく前報[20]に於いて添加 H-ase は 60,000 V. U. M. くらいでは殆んど精子に吸着されず 120,000 V. U. M. くらいの添加では，その若干が精子に吸着せられるが，これらの添加量は何れも精子の正常の活力の維持の限界を超えている．従つてす添加 H-ase により有効的に精子 H-ase の量を増をことが出来ないとするのが至当であること証した．

精液の中の H-ase が受精に関与するとしても之を単に Corona radiata の分散と云う観点からする受精前期のみならず，山根（1952）の示唆する如く受精後期に就いても H-ase の作用を考えるべきであろうと思われる．受精前期に作用するものは精液 H-ase であろうし，受精後期に作用するとすれば主として精子 H-ase であり特に潜在性精子 H-ase は重要なる役割を果たすものと思推せられる．然しながら添加 H-ase が精子に吸着されないと考えられる以上，受精後期に於ける添加の効果を期待することは無理の様に思われる．

性器内に注入された色素や染色精子が交尾によつて生ずる卵管や子宮の運動により卵管上部に達することが知られている．併しおそらくは性的感動を伴わないであろうと思われる人工授精に於いて，その様な生理的作用を必ず伴うかどうか疑問であるが，若しその様なことがあれば添加 H-ase は精漿と共に卵管上部の受精の場にまでも達するわけである．

本実験に於て 40,000 V. U. M. 程度以下の添加により受胎率の向上は望めなかつたし，勿論，用量による差異も認められなかつた．また既述のものとは別に邑久郡に於て直腸検査で診断して排卵の確実なホルスタイン種の牝牛1頭に対し人工授精前5分に 40,000 V. U. M. の H-ase を頸管内に注入したが3回とも受胎効果はなかつた．

10,000 V. U. M. の H-ase は前報[19]により略，精子1億の精液 H-ase に匹適する．精液原液の精子数を10億と仮定すれば10倍稀釈精液 1 cc. 中の精液 H-ase は略 10,000 V. U. M. となる．従つて 10,000 V. U. M. の酵素の添加は即ち酵素量を略，倍増することになるわけで，何程かの効果の期待も可能と思われる．然るに望ましい受胎成績が得られなかつたことは添加酵素が受精の場に達しなかつたか，精子が本来，充分の量の酵素を有しており添加酵素が効力を発揮する余地がなかつたか，または酵素そのものが受胎増進上の効果を欠くかの何れかであろう．

Leonard & Kurzrok（1945）は白鼠卵は牛睾丸 H-ase 0.1～0.5mg. で略1時間内に裸出されると報じており，また大谷[7]は家兎卵につき大量の H-ase で数分以内に裸出するが 0.01mg. の小量（之は 0.0045 cc. の人の精液即ち1回射精量の略1/600に相当する）でも約2時間後には Zona Pellucida の一部は裸出することを観察している．従つて極く微量の酵素でも受精の機会を増すものであり，稀釈した場合でも本来の精子 H-ase で必要限度を超えて充分の余裕があり，正常精液では H-ase の添加などは全く不必要なことではあるまいかと思われる．

McClean & Rowland（1942），Fekete & Duran-Reynals（1943）や Pincus（1930）その他の研究者の提唱した H-ase の意義からすれば受精前期に於ける Corona radiata の分散が H-ase の主なる役割であろうと解釈せられる．事実，卵管卵子が常によく発達した Corona radiata で囲まれていることはウサギ（Gregory, 1930；Pincus and Enzmann, 1932）モルモット（Squir, 1932）ラツテ（Gilchrist and Pincus, 1932）マウス（Lewis and Wright, 1935）ネコ（Hill

and Tribe, 1924）イヌ（Evans and Cole, 1931）ヒト（Allen et al., 1930 ; Hamilton, 1944）などで観察されている．

然るに一方 Leonard etc.（1947），Austin（1948），Lewis & Wright（1935）等はラッテまたはマウスで卵胞細胞の分散前に精子が Perivitelline space に侵入していることを報告しており，また卵が卵胞細胞に囲まれたまま精子の侵入を受けていることを Bowman（1951）はラッテに就て，Amoroso はネコに就て略同様なことを観察している．従つて他の動物は別として，之等の動物では Follicle cells や Corona radiata の分散が受精の必須前提条件であるとする諸説に疑問を生ずることになる．

また有蹄類の或るものでは Corona radiata は排卵後，間もなく消失するものであり，ウシ（Hartman et al., 1931 ; Evans and Miller, 1935 ; Hamilton and Laing, 1946）ヒツジ（Assheton, 1898 ; Mckenzie and Allen, 1933 ; Clark, 1934 ; Mckenzie and Terrill, 1937）ブタ（Assheton, 1898 ; Corner and Amsbaugh, 1917 ; Heuser and Streeter, 1929）及びウマ（Amoroso et al., 1939 ; Hamilton and Day, 1945）では Corona radiata 欠除が報告せられている．

H-ase は Zona pellucida または Vitelline membrane に対して作用するかも知れないが，上述の事が事実なら follicle cells や Corona radiata が分散せねば受精出来ないと云うことは論拠が薄弱になる様に思われる．批判はあるが，Swyer（1947）[8] は家兎の卵子の Corona radiata を分散させるものは H-ase ではなくて子宮から生産せられる他の因子に基づくと云つている．Yielding（1951）はイヌの関節嚢内への H-ase の注入により関節液の Na やK等の電解質が著るしく増量することを報告している．全く想像の域を脱しないが H-ase が生殖器粘膜表面で略同様な影響を与え組織の透過性を高めることにより電解質のみならず他の酵素や有機物の滲出を助け之が間接に生殖現象になんらかの影響を及ぼすこともあるかも知れない．

精子と卵子が合一し着床するまでには精子の条件，卵子の条件，それらの通路となる性導管の条件，受精卵の着床を全うせしめる条件など多くの要因が関与しており，妊娠と診断されるのは着床卵が完全な発育した場合であるから，それには一層多くの要因が関与することになる．従つてたとえ H-ase に受胎増進上の効果があるとしても，その率は比較的低いものとなるであろう．

大多数の哺乳類の無精卵は輸卵管末端部に達すると Corona cells は剥離するし細胞自体内に於ける変化によりそれらの分散がもたらされると云うことも唱えられている[9]．活動精子の存在は Corona cells の分散を助けるが，併し無精卵でも，自然にそれらの細胞は崩壊することが観察されているので，精子は必ずしも必要な要因とはならない様でもある．また山根(1930, 1935)の実験から H-ase でなくても Pancreatin の様な proteolytic enzyme でもCorona cells は分散する様に思われる．透明帯に貫入し之を通過するに種々問題はあると思はれるが，それに要する H-ase は本来の精子 H-ase で量的に充分であるのではあるまいか．

以上要するに本実験に於ては H-ase の正常な精液への添加または子宮頸宮内への注入による受胎効果を認めることが出来なかつた．その理由に就いては上述の如く考察された．併し乍ら精液中に，斯くも多量の H-ase が存在する以上，その生理的意義を否定するものではない．

ただこれまでの様に Corona radiata の離開のみにその意義を置かず，山根[17] の示唆する如く第二極小体の放出，従つて受精完了まで即ち受精後期に於ける意義を一層重視せねばならないのではあるまいか．また精子の活力衰退が精子からの H-ase の遊離を伴うことを，これまでの実験が示している以上，精子の活力を旺盛に保ち，受精の場及び卵内に，より多くの H-ase を

もたらすことが受胎率向上にとつて最も必要なことと思われる.

総 括

牛の人工授精に於ける H-ase 製剤の実際的価値を研究する為に次の4つの試験を行つた. それらや前報で得られた結果に基づいて, 人工授精に於ける H-ase 製剤の効果に関する論義を行つた. H-ase 製剤としては Sprase を用いた.

(1) 試験を要約すれば次の如くである.

第Ⅰ試験. 子宮頸管内注入 H-ase の受胎効果

35頭のホルスタイン牝牛に対し, 計47回の授精を行つた. その中, 34回は受精前20〜30分に2,000 v. r. u. または 5,000 v. r. u. の Sprase を1cc. の生理的食塩水に溶かして子宮頸管内に注入した. 残りの13回は対照区としH-aseの注入を行わなかつた(第1表). 受胎に対しH-ase製剤の評価すべき効果は得られなかつた.

第Ⅱ試験. 低倍率稀釈精液に添加せる H-ase 製剤の受胎効果

新鮮卵黄で3倍に稀釈した精液で61頭の初産のホルスタイン牝牛に対し授精を行つた.

生殖器は正常であり何等蕃殖障害はなかつたが第1回の授精で受胎しなかつた39頭の牝牛の中, 26頭を試験区とし, 上記稀釈精液1cc. に対し 50,000 v. r. u. の Sprase を添加した精液で授精し, その回数は45回であつた. 残りの13頭の正常牛を対照区とし H-ase を添加しない精液で授精し, その回数は22回であつた. 受胎は直腸検査によつて診断した(第2表). 両群に於ける受胎率は何れも略58%であり, 此の実験に於ても牡牛精液の受胎力に対し H-ase の添加効果はなかつた. これらの蕃殖記録は第3表に示した.

当然ではあるが, 産犢の性に対しても何等の影響もなかつた.

第Ⅲ試験. 高倍率稀釈精液に添加せる H-ase 製剤の受胎効果

卵黄ー葡萄糖ー枸櫞酸緩衝液でホルスタイン牡牛精液を稀釈し, 7倍稀釈精液に対しては5,000 v. r. u., 50倍稀釈精液に対しては 10,000 v. r. u., 70倍稀釈精液に対しては40,000 v. r. u. の Sprase を添加した.

試験区では, 上述の如く処理した精液で授精し, その回数は計71回であつた. 対照区は Sprase を添加しない精液で授精し, その回数は計123回であつた. 此の試験に於ても亦 H-ase 製剤の受胎に対する効果は認められなかつた(第4表).

第Ⅳ試験. 精液 H-ase と受胎率の相関

4頭の牡牛(ホルスタイン種3頭, 黒毛和種1頭)から32例の精液を得た(第5表). それらの精液 H-ase 力価と受胎率の間には相関関係は見出されなかつた. 此の事実は前述の実験の諸結果から期待せられることである.

(2) 授精前5分に1頭の牝牛の子宮頸管内に 40,000 v. r. u. の Sprase を注入した. 直腸検査による排卵の診断にもかかわらず, 此の用量に於てさえも, 3回とも受胎しなかつた.

(3) 此の研究に於ける諸結果から, 牛の人工授精に於ける H-ase 製剤の効果を認めることは出来なかつた. 此の結論を支持する様に思われる他の研究者の報告した例証を挙げ, 論議を行つた.

a). 精子の生存や活力の減退を来たさない量では, H-ase 製剤を加えても精子に吸収されない.

b). 正常精液に於ては精子は，その役割を演ずるに全く充分な酵素をもつている様に思われ，製剤の添加は必要でない様に思われる.

c). 有蹄類では排卵後間もなく，放線冠細胞が消失することが報告されている. 牛に就いてはこれらの細胞の欠除が報告されている（Hartman et al., 1931; Evans and Miller, 1935; Hamilton and Laing, 1946). 同様なことがヒツジ，ブタ及びウマでも記述されている. そこで放線冠細胞の分散はこれらの動物に於ては受精の前提必須条件ではない様である.

d). ラツテやマウスに於ては濾胞細胞で囲まれたままの卵子に精子が侵入しているのが観察されている.

（4）併し乍ら筆者等は受精の分野に於ける H-ase の役割を否定するものではない.

山根（1952）により与えられたる示唆により，卵に対する精子の貫入後に於ける，H-ase の意義も亦その貫入前に於けると同様に一層重視すべきであろう.

本研究を行うにあたり御援助を賜つた，岡山県岡山種畜場長幸島忠氏，岡山県邑久郡畜産農業協同組合技師柴田公夫氏及び岡山市内小林牧場技師吉田清氏に対し，また多量の Sprase の提供を戴いた持田製薬株式会社に対し深謝の意を表する.

文　　献

1) Chang, M. C. (1947); Effects of testis hyaluronidase and seminal fluids on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 66, PP. 51～54.

2) 原興吉，石川孝一，筒井政吉，門脇博（1953）; Hyaluronidase の添加と受胎率に就いて. 獣医畜産新報. No. 111, P. 469.

3) Johnston, J. E. and Mixner, J. P. (1950); Relationship of hyaluronidase concentration to fertility of dairy bull semen. J. Dairy Sci., 33～11, PP. 847～850.

4) 加来道隆（1951）; 拡散因子. 医学書院.

5) 加来道隆（1951）; ヒアルロニダーゼの産婦人科領域への応用. 産科と婦人科，18—4, PP. 19.

6) 西川義正（1944）; 家畜人工授精法. 養賢堂，P. 213.

7) 大谷善彦（1951）; 受精現象と拡散因子（Hyaluronidase）第二報. 日本産科婦人科学会雑誌，3—2, PP. 69～70.

8) Parkes, A. S. (1952); Marshall's physiology of reproduction, Vol. II, PP. 17～18, Longmans, Green And Co. Ltd.

9) Pommerenke, W. T. and Ellenmae Virgiver (1947); Comparison of rates of penetration of unwashed and washed spermatozoa in cervical mucus. Proc. Soc. Exp. Bio. Med., Vol. 66, PP. 161～163.

10) Sallman, B. and Birkeland, J. M. (1950); Interrelationships of spermatozoa count, hyaluronidae titer, and fertilization. Ann. N. Y. Acad. Sci., 52, PP. 1186～1191 (Animal Breeding abstracts, 19—4, PP. 468～469, 1951)

11) 榊原仟（1951）; ヒアルロニダーゼと臨床. 医学書院.

12) 高嶺浩（1951）; 牛の子宮頸管粘液に対する精子の侵入性とヒアルロニダーゼに就いて. 医学と生物学，18—2, PP. 62～65.

13) 高嶺浩（1952）; 受精とヒアルロニダーゼ及抗ヒアルロニダーゼに就いて. 畜産の研究，6—6, PP. 373～376.

14) 高嶺浩, 樋口三好, 小野寺強, 後藤寿久 (1954); 不妊牛に於けるヒアルロニダーゼの応用試験. 畜産の研究, 8—2, PP. 147～148.

15) 高島達夫 (1951); 精液中のヒアルロニダーゼに関する研究. 日本産科婦人科学会雑誌. 3—2, P. 69.

16) Yielding, K. L. and Rosano, C. L. (1951); Effect of hyaluronidase on electolytes (sodium and Potassium) of dog synovial fluid. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 78, PP. 54～56

17) 山根甚信 (1952); 繁殖生理学領域に於ける Hyaluronidase の意義. スプラーゼ文献集, 第二輯, PP. 60～69.

18) 和田宏 (1954); 牡牛精液ヒヤルロニダーゼの実験的不活性化及びその阻止. 岡山大学農学部学術報告, 4号 PP. 32～42.

19) 和田宏, 竹原宏 (1954); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究. (1) 牡牛精液の Hyaluronidase 力価について. 日本畜産学会報, 25巻, 2～4, PP. 111～117.

20) 和田宏, 竹原宏 (1954); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究. (2) 添加 Hyaluronidase が牡牛精子の活力に及ぼす効果. 岡山大学農学部学術報告, 5号, PP. 40～47.

21) 和田宏, 湯原正高 (1955); 人工授精に於ける Hyaluronidase に関する研究. (3) 精液中に於ける Hyaluronidase の分布及び精子による添加 H-ase の吸収. 岡山大学農学部学術報告, 6号, PP. 20～28.

作物の塩害に関する研究

第I報 その2 小麦の幼穂形成期*に与えられた塩水がその後の生育並に稔実に及ぼす影響

小 合 龍 夫・笹 井 一 男

Studies on the Saline Injury on Crops.
I—2 The Effect on the Growth and on the Maturity of Wheat as produced by the Saline Water Irrigation at the Ear Formation Period.**

T. Ogō and K. Sasai

The authors have investigated the specific effect on the growth and on the maturity of wheat (var. *Nōrin* No. 52) which was treated by the irrigation with saline water containing 2.5% NaCl during 10 days at the ear formation period.

The results obtained can be summarized as follows:

1. In the plants which were injured by the saline irrigation water at the ear formation period, the rate of reduction of days required for the development of symptoms of saline injury on leaves which already appeared was no larger than in the plants irrigated with the saline water at the other growing periods; but in the new leaf which developed after elimination of NaCl on the plants irrigated with the saline water at the ear formation period only the saline injury was observed to remain. However, the rate of increase of the injurious symptoms after elimination of NaCl on the different leaves on the main stem according to the leaf order was markedly smaller in the plants irrigated at the ear formation period than in the cases where the irrigation was made in the other periods.
2. Though the absolute increment of the symptoms of the saline injury due to the irrigation at the ear formation period was the greatest of all the plants which were injured by the saline irrigation at the other growing periods, the increment after elimination of NaCl was observed to be the smallest in the case where saline irrigation was made in the ear formation period. Therefore, it may be said that the plants irrigated with the saline water at the ear formation period was under the injurious effect of NaCl for a shorter period than those which were irrigated at the other periods.
3. In the plants which were injured on the ear formation period and in the periods just before this period, it was observed that the number of leaves incresed.
4. The average number of grains in a spikelet, the average weight of one grain and the maturity index were the greatest in the plants irrigated at the ear formation period.

* こゝで云う幼穂形成期とは特に小穂分化後期をさす.（末次（1949）の分類に従う）
** The ear formation period gives the differentiation of the terminal spikelet.

緒　　　言

作物の生育が環境に適応して行く能力は各生育相に依つて夫々異なる事は勿論であり，従つて各生育時期に与えられる障害に大小があることも論を待たない．

前報に於て筆者等は塩害による伸長の一時的停止が生育の初期のものに著しく，特に幼穂形成期の塩害はこれが極めて長期に亘ることを認め，此の生育時期が小麦の生育，収量に最も大きな危険期である如く推察した．又主稈の出葉も生育初期の塩害によつて遅延が著しかつたが，幼穂形成期に塩害を受けたものを除いては何れも出穂期に至る迄に殆んど回復した．尤も幼穂形成期のものでも，或る程度の回復が見られるが，一方に葉数を増す事実も認められて，被害には補償的作用のある事を推察するに至つた．又葉位別に見た害徴の現れ方及各葉平均枯死速度に於ては新葉の生活機能が延長せられて作物体の回復を促進している様な事実も認め，更に又一穂稔実粒数，同粒重，同平均小穂数，同平均不稔小穂数等収量に関係する要素は生育後期の塩害の場合に顯著である事実を認めた．以上の事実に基いて被害の大きい時期は開花期，出穂期，登熟初期についで幼穂形成期である事を報告した．

然して上述の調査はそれ等が大綱を知る上に充分であつたが，与えられた塩害が要因除去後の生育に如何なる関係を有するかについて2，3の考察を試みた．本文に於ては葉身に現われる害徴の消長と，更に稔実を支配する作物体自体の状態について主として報告し，前報を補うこととする．

実験方法，結果及び考察

小麦農林52号を11月10日 1/2万 Wagner pot に播種し，ガラス室内に於て砂耕試験を行つた．塩水は培養液原液*の1％液に対して2.5％の濃度をもつ人工海水を用い，第1表の如き試験区を設けた．

1）葉身部の害徴

害徴出現率とその増加率及び葉数等の関係，更に害徴の増加量と経過日数等の関係から塩害経過の考察を行つた．害徴出現率の調査は第10葉まで葉位別に行つたもので，塩水添加より害徴が出現し始める迄の日数の標準無処理区に於ける同葉が自然枯死を始める迄の日数に対する比率で示した．従つて此の値が1以下である場合にはその値が小さくなる程，害徴の出現が早められ，1以上である場合には無処理よりも長く生活機能をもつているものと解すべきで，この値の大小が直接当時の塩害に対する抵抗力の大小に関係するものと考えた．

又害徴増加率は播種後152日迄に完全枯死を認めた葉位について行い，害徴の出現し始めた日より，同葉が完全枯死に至る迄の日数によつて求められた害徴増加線の平均の傾きによつて示した．この害徴増加線は必ずしも直線を示すとは限らないが，一応直線と見做した平均角度をもつて示す事にした．然して此の角度が小さくなる程害徴の進行速度が遅くなる事は云うまでもな

* 培養液原液は次のA液，B液を等量に混じたものを用いた．

A　液 { KH_2PO_4 ………… 75g / $(NH_4)_2SO_4$…… 37.5g / $MgSO_4 7H_2O$……100g / 蒸　溜　水……1000cc }

B　液 { $Ca(NO_3)_2H_2O$ …………37.5g / 蒸　溜　水……………1000cc }

Table 1. Design of Experiments

Plot No.	Treatment period by the irrigation with saline water (days after sowing)	Growing stage
C	0	Check (Untreated)
2	7—17	↑
3	17—27	Tillering
4	27—37	
5	37—47	↓ ↑ Ear formation period on the main stem
6	42—52	Ear formation period on the 1st and 2nd tiller
7	47—57	Jointing
9	57—67	
11	67—77	
12	77—87	↓ Reproductive cells formation period
13	87—97	Boot
14	97—107	Heading
15	107—117	Flowering
16	117—127	↑
17	127—137	
18	137—147	Maturing
19	147—157	↓

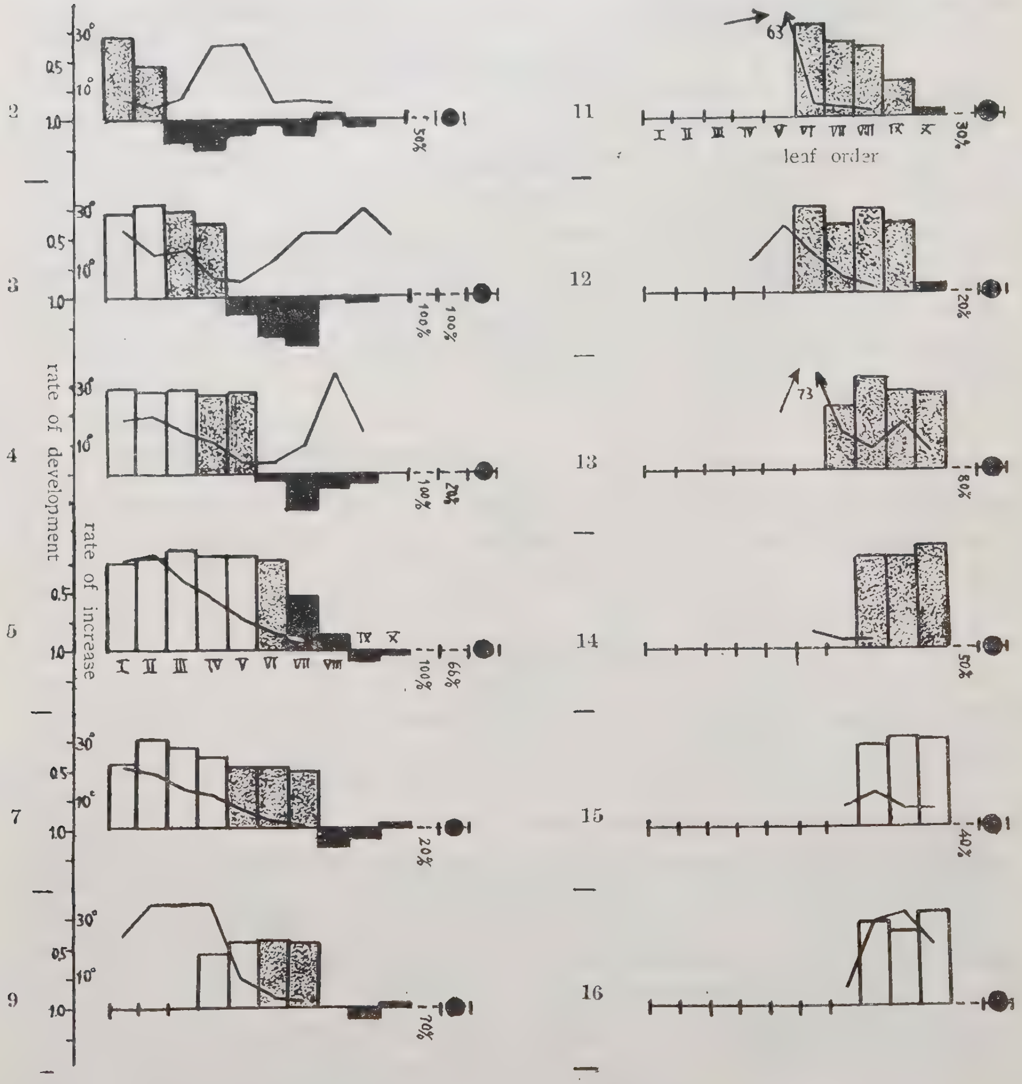
い．尚害徴の表示*については既報所載の指数に従つた．

第1図に示した如く，塩水を添加すれば必ず葉は枯れ始めて塩害の徴候を示し始める事は明かである（棒グラフ参照）．即ち塩水添加時の既存葉は各区とも何れも急激に害徴を示し始めるが，塩害を与えた時期により，又葉位によつて，その害徴出現までの日数の短縮される割合は僅かに異り，特に第5区の幼穂形成期及び第15，16区の出穂，開花期の被害を認める事が出来る．即ち既存葉の害徴出現迄の日数が短縮される場合にも，塩水除去後に枯れ始める場合と添加中に枯れ始める場合とあるが，この両時期を除いては比較的短縮の割合が大きくても，塩水除去後に枯れ始める場合が多く，従つて幼穂形成期，出穂，開花期はその絶対量に於て最も大きい事が伺える．又塩水除去后新葉を抽出するものでは，幼穂形成期を除いて，新葉にはすべて塩害が認められず，かえつて自然枯死の場合よりも枯れ始めが遅くなつている．然し幼穂形成期に於ては，新葉にも尚被害が残るが如く認められているが，更に葉位が進むと前述の如く自然枯死の場合よりも遅く枯れ始める様になる．この現象はただ生理的の週期現象として現われているのかもしれないが，恰も蒙つた塩害を補償する方向にある様に思われ，塩害経過後の生育に見られる一

* 害徴の表示は各葉身部に於て次の如く分類し，夫々の指数を与えた

全葉稍黄色又は先端褐色…………1，　全葉黄色……………3.
半葉黄色又は褐色…………………2，　全葉枯死……………4.

Fig 1. Injurious degree on the different leaves on the main stem



□ : The rate of reduction of days required for the development of injurious symptoms on the leaf showed the injurious symptoms before elimination of NaCl

▨ : The rate on the leaf showed the injurious symptoms after elimination of NaCl

■ : The rate on the leaf developed after elimination of NaCl

●: Ear

Curve line : The rate of increase of the injurious symptoms

% : The rate of development of 11th or 12th leaf

特殊過程と考える事が出来る．

次に枯れ始めを起してから完全に枯死する迄の速度即ち害徴増加率については同図の曲線グラフで示した如く，葉位の進むに従つて減少し，塩水除去に従つてその速度が減退する事は勿論であるが，害徴出現率がたとえ同率であつても，この減退量は各区各葉に依つて異り，塩水に対する反応の種々なる形態が此の点にも示されているものと思われる．即ち幼穂形成期の処理では他の区に比較して，害徴の出現は極めて早められているにも拘わらず，増加率は葉位の進むと共に激減しており，後期に出葉した葉では生理機能が永続せられている事を認める事が出来る．

又害徴の出現の速かなる時期に，かえつて増加率が低く，害徴の出現が比較的遅い割に増加率が高い場合がある．之は既に Curtis (1943), Ivanoff (1944) 等が認めている如く，除塩後は急激に水分を吸収し，溢泌現象 (guttation) に依つて体内集積の塩分が水と共に排出され，次第にその塩水が濃縮される結果，細胞を直接破壊する現象によるもので，除塩後に於ける塩害の後作用を認めるものであり，比較的塩害の小さい場合に多く認

Fig 2. Injurious degree after elimination of saline water

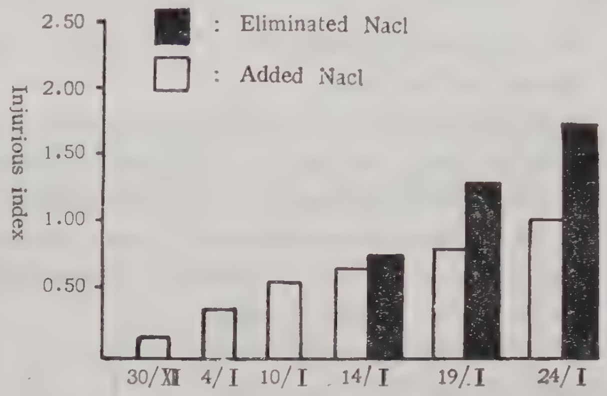
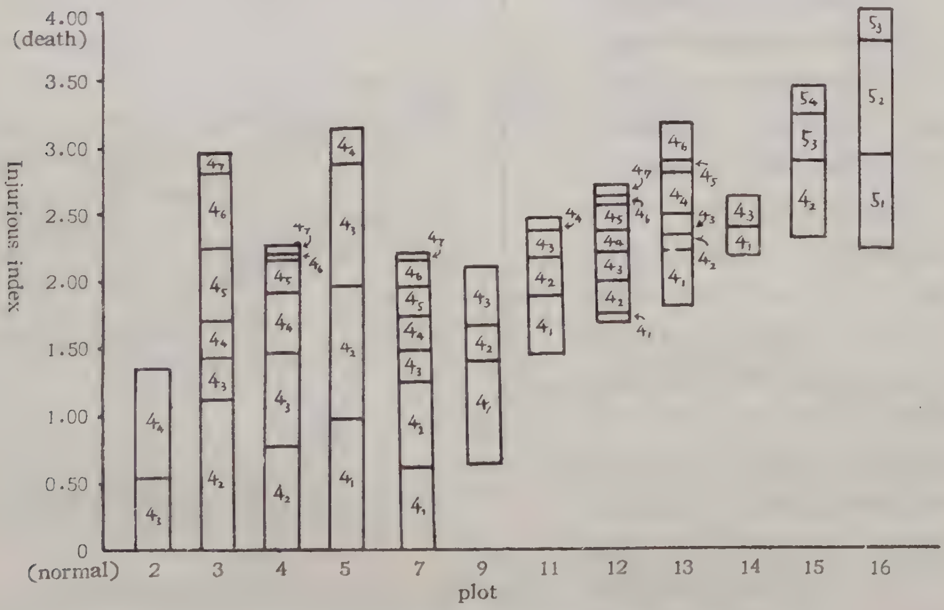


Fig 3. The relation between the increment of symptoms of saline injury and the elapsed days



Note : 4_1 gives the increment of injurious symptoms for the first 4 days.
The same rule applies correspondingly to the other,

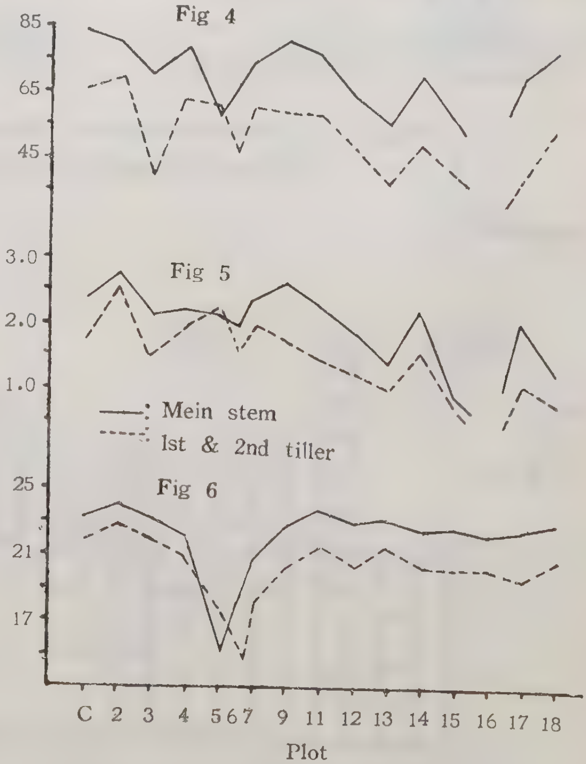
められる様である．即ち第2図に示した如く，1.0％の塩水を与えた場合，除塩された場合が塩水添加を続けた場合に比して害徴が著しく進んでいる点から伺う事が出来よう．此の現象については後日，生理形態事項と共に詳細に報告の予定である．

又生育の後期（第15，16区）では害徴出現率が極めて小さくなると共に，各葉の害徴増加率が殆んど不変で，特に第16区ではこの増加率の絶対量が大きく，各葉が殆んど同時に，同速度で枯死して行く事が認められ，所謂“枯れ上り”とも云うべき現象を呈し，生育末期の被害を大きく示す因となるものであろう．

又葉数については前報所載の如く，被害の著しかつた生育初期，幼穂形成期のものでは標準区に比し，葉数が増し，塩害経過后の生育が之等被害の程度と関連なく行われている事が推察せられる．

従つて被害が生育限界を超えないものである限り，時期的の抵抗力と云うべき問題に関しては一概に論ずわけにはいかない．

又第3図は主稈の葉身に於ける平均害徴の増加量と経過日数との関係を示したもので，生育初期の塩害区（第2，3，4区）では塩水添加時より最初の4日間或は次の4日間には害徴が現われないが，次第に生育時期が進むに従い被害の出現が早まる様である．又同図に示された害徴指数の上限即ち被害の消滅は害徴進行停止と新葉の抽出等で平均害徴の増加量が0になつた日数を記載したが，之によると第2区では 4_4 即ち塩水添加後16日目には完全に害徴の増加量を上回る回復を示し，第3，4区の生育初期に塩害を受けたものでは，害徴の出現が塩水除去前に急激にあらわれ，塩水を除去しても増加量が多少減少するに止り，尚も被害を増して完全に回復を見たのは 4_7 即ち28日目の長き期間を要した．更に第5区の幼穂形成期の塩害区のものでは塩水除去前の増加量が極めて大きく，既述した如く，外観的初期被害は全生育相を通じて最高の値を示しているが，然し塩水を除去した場合の回復は極めて早く，4_4 即ち16日目に旧に復している．従つて第3，4区に見られる如く，回復力を見せる迄の害徴の増加が比較的少くても，回復迄に長期を要していることはその後の生育にも関連するものの如く，幼穂形成期の如き短期間の経過はその後の生育に好結果を招くものと考えて差し支えあるまい．従つて此の時期の塩害の経過を綜括すると，決して被害が大きい時期とは論断出来ない事になろう．然し



Note : Fig 4 : Average number of grains in an ear
Fig 5 : Average weight of grains in an ear
Fig 6 : Average number of spikelets in an ear

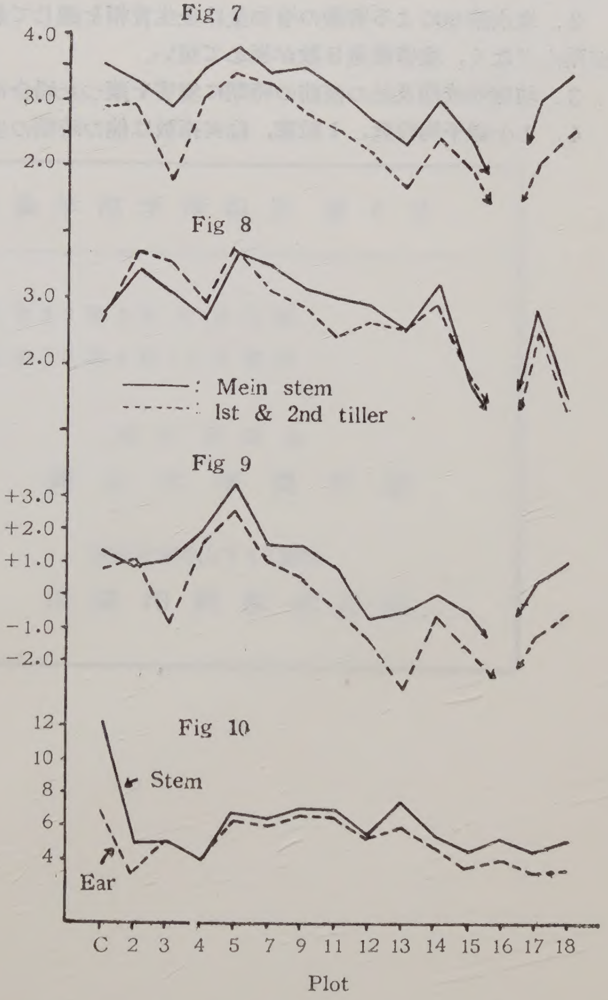
塩水除去前の害徴増加量が極めて大きい事は第16区に見られている如く，速に完全枯死に到達する可能性も考えられ，此の期の被害の限界は極めて微妙である事を認めた.

2）稔　　実

前報に報告した如く，幼穂形成期に塩害を受けた場合には小穂数が著しく減じ，従つて1穂粒数も著しく減じ，1穂粒重も少く，抵抗性の小さい結果となつている.（第4，5，6図）. 然し前項の葉身部害徴の推移によつて，抵抗性の小さいと推定した生育後期は同図に見られる結果と一致して，容易に了解せられるが，幼穂形成期の抵抗性を推定した結果には必ずしも満足なものとは云えない. 更に又塩害経過後の回復に伴う除塩後の生育が一部には塩水添加と関連なく行われる事を論じた以上，稔実も亦之等被害と関連なく行われねばならない訳になるからである. 従つて稔実を主体に考えて見ると，小穂数は減じて，1穂粒数は減少するが，1小穂に稔実する粒数は第7図に示す如く，明に何れの区よりも良い結果を認める事が出来るであろう. 又之に伴つて1粒重も最高値を示し，肥大に関しても最も良好な状態にあつた.（第8図).

更に稔実状態は第9図に示した如く，明に幼穂形成期に塩害を受けたものが最良の条件を有している事が認められる. この稔実状態を示す指数は1穂中に見られる下部不稔小穂数と最下位稔実小穂粒数との差によつて示されているもので，下部不稔小穂が多く生ずる場合は稔実に伴う生理機能が環境に適合していない事を示しているものであろう. 又第10図に示した如く，茎数，穂数に於ても，この幼穂形成期に塩害を受けたものが特に減少する事実はなく，弱小分蘖の抑制とか，穂数の減少によつて稔実を良好にした結果とは考える事は出来ない. かえつて生育後期のものが塩害によつて穂数が減少しているにも拘わらず，之等が結果の見られないのと比較して明な事実であろう.

以上塩害の程度と稔実の関係から幼穂形成期の塩水の影響が極めて興味ある経過をたどつた事は常にこの時期が



Note : Fig 7 Average number of grains in a spikelet
Fig 8 Average weight of one grain
Fig 9 Maturity index
Fig 10 Average number of ears and stems

災害の対象とならなければならない事由を再考せしむるものとなろう.

然して本結果に見られる如く，幼穂形成期の塩害は要因除去後に現われた特異現象が稔実に相当の好条件を与える場合もあるので，現地干拓地の種場問題とも関連して更に追求せられるべきものではなかろうか.

摘　　要

小麦農林52号を供試し，生育時期を異にして各10日間づゝ2.5%の塩水を与えた場合，特に幼穂形成期に於ける塩害経過後の生育並に稔実には次の如き2,3の特異現象があらわれた.

1．害徴出現率では新葉にも未だ被害を認めるが，除塩後，葉位の進むに従つて葉位別の害徴増加率は他の時期の塩害区に比して著しく減少する.

2．塩水添加による害徴の増加量は全生育相を通じて最大であるにも拘わらず，除塩後の増加が殆んどなく，塩害経過日数が極めて短い.

3．幼穂形成期及此の直前の時期に塩害を蒙つた場合には葉数が増す.

4．1小穂平均粒数，1粒重，稔実指数は他の時期の塩害区に比して極めて良い.

岡山大学農学部学術報告 第6号

昭和30年3月 5 日印刷
昭和30年3月10日発行

岡山市津島
編輯兼発行者 岡山大学農学部

岡山市東中山下40番地
印刷所 山陽印刷株式会社